



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA AYUMI BRAGHINI

**MECANISMOS MOLECULARES DE REGULAÇÃO DO
GENE *HBG1* ASSOCIADOS AOS GENÓTIPOS -195 C→G, -175
T→C e -117 G→A DE PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE
HEMOGLOBINA FETAL NÃO-DELECIONAL**

**MOLECULAR MECHANISMS OF *HBG1* GENE
REGULATION ASSOCIATED WITH THE -195 C→G, -175
T→C AND -117 G→A GENOTYPES OF NON-DELECIONAL
HEREDITARY PERSISTENCE OF FETAL HEMOGLOBIN**

CAMPINAS

2016

CAROLINA AYUMI BRAGHINI

**MECANISMOS MOLECULARES DE REGULAÇÃO DO GENE
HBG1 ASSOCIADOS AOS GENÓTIPOS -195 C→G, -175 T→C e -117
G→A DE PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE HEMOGLOBINA
FETAL NÃO- DELECIONAL**

**MOLECULAR MECHANISMS OF *HBG1* GENE REGULATION
ASSOCIATED WITH THE -195 C→G, -175 T→C AND -117 G→A
GENOTYPES OF NON- DELECIONAL HEREDITARY
PERSISTENCE OF FETAL HEMOGLOBIN**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Thesis presented to the Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology, in the area of Animal Genetics and Evolution.

***Orientador:* Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINA AYUMI BRAGHINI, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA.**

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/07869-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B73m Braghini, Carolina Ayumi, 1985-
Mecanismos moleculares de regulação do gene HBG1 associados aos genótipos -195 C→G, -175 T→C e -117 G→A de persistência hereditária de hemoglobina fetal não-delecional / Carolina Ayumi Braghini. – Campinas, SP: [s.n.], 2016.

Orientador: Fernando Ferreira Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Persistência hereditária de hemoglobina fetal. 2. Globina-gama. 3. Interferência de RNA. 4. Regulação da expressão gênica. I. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular mechanisms of HBG1 gene regulation associated with the -195 C→G, -175 T→C and -117 G→A genotypes of non-delecional hereditary persistence of fetal hemoglobin **Palavras-chave em Inglês:**

Hereditary persistence of fetal hemoglobin

Gamma-globins

RNA interference

Gene expression regulation

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular **Banca examinadora:**

Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Edi Lúcia Sartorato

José Andrés Yunes

Maria Stella Figueiredo

Antônio Fabron Júnior

Data da defesa: 31-08-2016

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 31 de agosto de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (Orientador)

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Prof. Dr. Antônio Fabron Júnior

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Odes de Ricardo Reis. Fernando Pessoa, 1946

Dedicatória

Dedico esta tese à pessoa que mais admiro neste mundo: minha mãe.
Uma das pessoas mais fortes, tolerantes, generosas e sábias que conheço.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, meu mentor, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação, pelos ensinamentos e pelas oportunidades a mim oferecidas que me proporcionaram crescimento pessoal e científico nesses anos de doutorado. Ao senhor, o meu muito obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Kenneth Peterson, meu outro grande mentor, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por ter colaborado tanto para meu amadurecimento científico, sempre estimulando o pensamento crítico em seu laboratório.

Aos membros da banca da Defesa de Tese, da Banca Prévia e do Exame de Qualificação, Dra. Maria Stella Figueiredo, Dr. Antonio Fabron Junior, Dr. José Andrés Yunes, Dra. Edi Lúcia Sartorato, Dra. Fabíola Traina, Dra. Maria de Fátima Sonati e Dr. Marcus A. Finzi Corat, pelo tempo disponibilizado e pelas valiosas contribuições à tese.

Aos indivíduos com persistência hereditária de hemoglobina fetal tipo Brasileira e aos indivíduos controles que aceitaram participar e colaborar com esse trabalho.

Ao Kleber Fertrin (Kevin/"Klever"/Kreberson) e à Nicola Conran (a Nic), pesquisadores brilhantes com os quais eu tive o privilégio de conviver e aprender! Adoro vocês!

À Dulcineia Albuquerque (a Dul), à Carol Lanaro, ao Andrey Santos, à Carla Penteado, à Dani Leonardo e à Pri Boyano, obrigada pela paciência com essa Japa aqui (eu sei que eu dou trabalho), pela ajuda, pelos ensinamentos e pela eficiência em resolver pepinos!

À Flávia "Boca/Pugliesi", uma amiga querida que o doutorado me deu de presente, com um coração enorme, engraçada e autêntica! Obrigada pela parceria!

À Hanan e ao Felipe, o casal mais querido desse Brasil! Muito obrigada pela generosidade, pela amizade e pela parceria!

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobina e Genoma, do Laboratório de Inflamação Vascular e do Laboratório de Biometais que já não fazem parte do nosso convívio, pois estão alçando outros vãos: Thaís, Marina, Marília, Maria Emília, Ana Flávia, Tati, Diana, Telma, Cíntia, Daiana, Venina, Camila, Renata, Flávia Lopes, Flávia Pallis (Marmoteenha), Vanessa, e aos que eu ainda tenho o prazer de conviver: Fábio, Thomás, Cris, Regiane, Selma, Oladele, Lediane, Wilson, Cecília, Rafaela, Angélica, Pâmela, Fernanda, Flávia, Myriam,

Marina e Letícia. Obrigada pelas risadas, pela troca de conhecimento e por saberem lidar com a minha efusividade!

Aos amigos do Peterson's Lab, Matt, Halya, Lesya, Rennè e Alan! Obrigada pela cooperação e por me ensinarem tanto!

À dupla da citometria de fluxo Ana Leda e Irene. Vocês são ótimas! Obrigada por toda a ajuda, ensinamentos e pelas risadas!

À Ucha (Xuxa), à Simone Sene (Simonete) e à Dri por terem me ajudado tanto e por serem pessoas tão especiais!

À Karla Ferro por me socorrer sempre que eu precisei! Obrigada por compartilhar seu conhecimento e seus reagentes!

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular por toda a ajuda!

À Ana Luísa, Paty, Raquel e Tereza, pela eficiência e ajuda!

À minha família, pelo apoio incondicional! Amo vocês!

Ao Jarrod, meu amigo, meu companheiro, meu parceiro! Obrigada por ter cruzado minha vida e por ter permanecido ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, dando forças e acalento!

À Fapesp e à CAPES pelo apoio financeiro.

A persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) é uma condição caracterizada pela elevada síntese de globina- γ e, portanto, de hemoglobina fetal (HbF), em células eritroides adultas, devido a uma falha no switching de HbF para hemoglobina adulta (HbA). A HbF é o principal modificador genético da heterogeneidade fenotípica de pacientes portadores das principais desordens de globina β : anemia falciforme e talassemia- β . Assim, as pesquisas científicas têm focado na elucidação dos mecanismos envolvidos na manutenção ou reativação da expressão dos genes *HBG1* (globina- γ^A) e *HBG2* (globina- γ^G) por terapias medicamentosa ou gênica. Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de fatores de transcrição estágio específico no switching de hemoglobina, indicando o potencial para uso terapêutico desses fatores de transcrição no tratamento das hemoglobinopatias. Uma vez que muitas mutações de PHHF afetam diretamente ou indiretamente a ligação de fatores de transcrição, nesse estudo, foram analisadas proteínas que potencialmente se ligam à sequência tipo selvagem e na presença das mutações de PHHF não deletional no gene *HBG1* -117 G \rightarrow A, -175 T \rightarrow C e -195 C \rightarrow G, utilizando células humanas das linhagens eritroleucêmica KU812 e K562 e, células primárias CD34+ progenitoras eritroides, bem como camundongos transgênicos contendo o locus humano de globina- β em cromossomo artificial de levedura (β -YAC) e cultura de células derivativas da medula óssea desses animais dependentes de CID. Para tanto, lançamos mão de diversas técnicas como qPCR, EPR, imunoprecipitação de cromatina e RNAi. O ChIP em células de cultura eritroide primária humana mostraram o maior recrutamento do fator de transcrição YY1 na sequência selvagem do promotor do gene *HBG1*, indicando sua possível atuação como repressor desse gene. Já na sequência mutada do promotor (-195 C \rightarrow G), YY1 deixa de se ligar, e PAX1 passa a ser recrutado, sugerindo que esse fator de transcrição possa atuar como indutor da expressão do gene *HBG1*. Os efeitos do silenciamento gênico de *YY1* nas linhagens de células K562 e KU812 não corroboraram com os achados no ChIP, uma vez que a menor expressão do gene *YY1* levou à diminuição da expressão de globina- γ nessas células. Já o silenciamento de *YY1* em cultura de células primárias humanas progenitoras eritroides causou aumento da expressão do gene *HBG1*, diferentemente dos resultados encontrados no silenciamento nas linhagens celulares K562 e KU812. Em células isoladas de fígado fetal do dia E18 de camundongos transgênicos β -YAC, os ensaios de ChIP mostraram aumento significativo do recrutamento dos fatores de transcrição LMO2, TAL1 e LDB1 na presença da mutação de PHHF -175 C \rightarrow T. Contudo, os

resultados de imunoprecipitação de cromatina em células dependentes de CID e de fígado fetal dos dias E12 e E18 não corroboraram os resultados encontrados em células humanas, nos quais o fator de transcrição YY1 é mais recrutado na condição controle e PAX1 mais recrutado no promotor do gene *HBG1* mutado (-195 C→G). Uma melhor compreensão da regulação da expressão dos genes da globina é clinicamente relevante, uma vez que o elevado nível de globina- γ resulta na melhoria dos sintomas de pacientes com anemia falciforme e talassemia- β .

ABSTRACT

The hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) is a condition characterized by elevated synthesis of γ -globin and therefore fetal hemoglobin (HbF) in adult erythroid cells, due to a failure in the HbF switching to adult hemoglobin (HbA). HbF is the main genetic modifier of the phenotypic heterogeneity of patients with major disorders of β -globin: sickle cell anemia and β -thalassemia. Thus, scientific research has focused on the elucidation of the mechanisms involved in maintaining or reactivate the expression of *HBG1* (globin- $^A\gamma$) and *HBG2* (globin- $^G\gamma$) genes for drug or gene therapies. Several studies have demonstrated the involvement of stage-specific transcription factors in hemoglobin switching, indicating the potential for therapeutic use of these transcription factors in the treatment of hemoglobinopathies. Since many HPFH mutations affect directly or indirectly the binding of transcription factors, in this study we analyzed the potential proteins that bind in the wild type sequence and in the presence of non-delecional HPFH mutations -117 G \rightarrow A, -175 T \rightarrow C and -195 C \rightarrow G in the *HBG1* gene, using human cells of the erythroleukemic lineage KU812 and K562 and the primary CD34 $^{+}$ erythroid progenitor cells, as well as transgenic mice containing the human β -globin locus in yeast artificial chromosome (β -YAC) and its derivative CID-dependent bone marrow cells of these animals. Therefore, we used a variety of techniques such as qPCR, EPR, immunoprecipitation of chromatin and RNAi. The ChIP assay in primary human erythroid cell culture showed an increased recruitment of YY1 transcription factor in the wild sequence of the *HBG1* gene promoter, indicating its possible role as a repressor of this gene. In the mutated promoter sequence (-195 C \rightarrow G), YY1 fails to bind, and PAX1 is recruited, suggesting that this transcription factor may act as an inducer of expression of the gene *HBG1*. The effects of the *YY1* gene silencing in KU812 and K562 cell lines did not corroborate the findings of the ChIP, since the lower expression of *YY1* gene led to a decreased γ -globin gene expression in these cells. Nevertheless, the knockdown of *YY1* in cultured erythroid progenitor human primary cells caused increased expression of the *HBG1* gene, different from the results found in the knockdown assay in the K562 and KU812 cell lines. In cells isolated from fetal liver of day E18 of β -YAC transgenic mice, the ChIP assays showed significant increase in the recruitment of transcription factors LMO2, LDB1 and TAL1 in the presence of the HPFH mutation -175 C \rightarrow T. However, the results of chromatin immunoprecipitation-dependent cell CID and fetal liver from E12 and E18 days did not

corroborate the results from human cells, where the YY1 transcription factor is more recruited in the control condition and more recruited PAX1 in *HBG1* mutated gene promoter (-195 C→G). A better understanding of the regulation of the expression of the globin genes is clinically relevant, because the high level of γ -globin results in amelioration of symptoms in patients with sickle cell anemia and β -thalassemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Hematopoese adulta e fatores de transcrição envolvidos nesse processo.....	22
Figura 2.	Estabelecimento das HSCs definitivas durante o desenvolvimento embrionário.....	23
Figura 3.	Esquema global da eritropoese: regulação em múltiplos níveis por múltiplas proteínas, hormônios e miRNAs.....	25
Figura 4.	Eventos envolvidos na geração dos dois clusters de globinas humanas ao longo da evolução.....	28
Figura 5.	Produção das globinas durante o desenvolvimento ontogenético normal.....	29
Figura 6.	Tipos de PHHF deletoriais.....	31
Figura 7.	Representação esquemática do mecanismo molecular proposto para a reativação do gene <i>HBG1</i> na PHHF não deletorial tipo Brasileira.....	35
Figura 8.	Diagrama do locus β humano.....	37
Figura 9.	Eletroferograma do sequenciamento do gDNA.....	41
Figura 10.	Maturação eritroide das células coletadas nos dias 7, 10 e 13 de cultura de células progenitoras eritroides humanas.....	44
Figura 11.	Locus de globina- β humano de 213 kb, inserido em cromossomo artificial de levedura (β -YAC).....	46
Figura 12.	Tecnologia de dimerização utilizada para estabelecer as populações proliferativas de células dependentes de CID.....	47
Figura 13.	Silenciamento gênico mediado por shRNA e siRNA.....	50
Figura 14.	Resultados de EPR das globinas humanas β e γ A, e da globina murina α	55
Figura 15.	Análise de citometria de fluxo de células isoladas de amostras de sangue periférico de camundongos transgênicos adultos, utilizando anticorpo anti-HbF conjugado à FITC.....	57
Figura 16.	Análise de ChIP de células dependentes de CID derivadas da medula óssea de camundongos transgênicos β -YAC.....	58

Figura 17.	Ensaio de ChIP com amostras de fígado fetal dos dias E12 e E18 de camundongos transgênicos β -YAC.....60
Figura 18.	Ensaio de ChIP com amostras de fígado fetal do dia E18 de camundongos transgênicos β -YAC.....61
Figura 19.	Ensaio de ChIP com amostras de fígado fetal do dia E18 de camundongos transgênicos β -YAC selvagem e com a mutação de PHHF -175 T→C, utilizando anticorpos anti-TAL1, anti-LMO2 e anti-LDB1.....63
Figura 20.	Esquema da cultura primária eritroide.....64
Figura 21.	Recrutamento dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 no dia 13 da cultura eritroide controle e proveniente de portadores de ndPHHF tipo Brasileira.....64
Figura 22.	Esquema da cultura das linhagens eritroides K562 e KU812 e silenciamento gênico.....65
Figura 23.	Expressão gênica relativa dos genes <i>YY1</i> e <i>HBG1</i> em cultura de células K562 no ensaio de silenciamento do gene <i>YY1</i>66
Figura 24.	Expressão gênica relativa dos genes <i>YY1</i> e <i>HBG1</i> em cultura de células KU812 no ensaio de silenciamento do gene <i>YY1</i>67
Figura 25.	Esquema do novo método de cultura primária eritroide.....68
Figure 26.	Análise do marcador de superfície CD34, por citometria de fluxo, de cultura de células primárias humanas hematopoéticas.....69
Figura 27.	<i>Dot plots</i> da análise da diferenciação eritroide, por citometria de fluxo, de cultura de células primárias humanas hematopoéticas.....69
Figura 28.	Avaliação da diferenciação eritroide por coloração de Leishman da cultura humana primária de células progenitoras eritroides.....70
Figura 29.	Esquema da cultura primária eritroide.....71
Figura 30.	Expressão gênica relativa dos genes <i>YY1</i> e <i>HBG1</i> em células de cultura eritroide de indivíduo controle no ensaio de silenciamento do gene <i>YY1</i> por <i>siRNA</i>72
Figura 31.	Esquema da cultura primária eritroide.....73
Figura 32.	Expressão gênica relativa dos genes <i>YY1</i> e <i>HBG1</i> em células de cultura eritroide de indivíduo controle no ensaio de silenciamento do gene <i>YY1</i> por <i>shRNA</i>74

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Tipos de PHHF não delecionais já descritas, com alterações nos genes <i>HBG1</i> e <i>HBG2</i> (Adaptado de Angastiniotis et al., 2013).....	32
Tabela II.	Índices hematimétricos dos 3 portadores de PHHF não delecional tipo Brasileira incluídos nesse estudo.....	40
Tabela III.	Índices hematimétricos dos 3 indivíduos controle incluídos nesse estudo.....	41
Tabela IV.	Média \pm desvio padrão das cadeias globínicas- γ (CLAE-EM) e níveis de RNAm (EPR e qPCR), em diferentes linhagens de camundongos transgênicos β -YAC, normalizados pelo total de cadeias globínicas- β ou seus níveis de RNAm, respectivamente; $[\gamma/(\beta+\gamma)] \times 100$. Os valores de qPCR foram normalizados de acordo com os valores de expressão do RNAm da globina- α murina.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Adenosina citrato dextrose
AF	Anemia falciforma
<i>BCL11A</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 11 gene</i>
BSA	Albumina sérica bovina
β -YAC	<i>Beta globin yeast artificial chromossome</i>
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
CID	Indutor químico de dimerização
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTRL	Indivíduos controle
dHPLC	Cromatografia líquida desnaturante de alta performance
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTP	Deoxinucleotídio trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética
EPO	Eritropoetina humana
EPR	Ensaio de proteção de ribonuclease
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>FOG-1</i>	<i>Zinc finger protein, FOG family member 1 gene</i>
<i>GATA-1</i>	<i>GATA binding protein 1 gene</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
<i>HBA1</i>	<i>Hemoglobin subunit alpha 1 gene</i>
HbA2	Hemoglobina A2
<i>HBA2</i>	<i>Hemoglobin subunit alpha 2 gene</i>
<i>HBB</i>	<i>Hemoglobin subunit beta gene</i>
<i>HBD</i>	<i>Hemoglobin subunit delta gene</i>
<i>HBE</i>	<i>Hemoglobin subunit epsilon gene</i>

HbF	Hemoglobina fetal
<i>HBG1</i>	<i>Hemoglobin subunit gamma A gene</i>
<i>HBG2</i>	<i>Hemoglobin subunit gamma G gene</i>
HbS	Hemoglobina S
<i>HBZ</i>	<i>Hemoglobin subunit zeta gene</i>
<i>HS</i>	<i>Hypersensitive site</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL-3	Interleucina-3
IL-6	Interleucina-6
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
<i>KLF</i>	<i>Kruppel-like factor 1 gene</i>
LCR	<i>Locus Control Region</i>
<i>LDB1</i>	<i>LIM domain binding 1 gene</i>
<i>LMO2</i>	<i>LIM domain only 2 gene</i>
<i>LRF</i>	<i>Leukemia/lymphoma-related factor/zinc finger and BTB domain containing 7A gene</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
<i>Mi2-β</i>	<i>Chromodomain helicase DNA-binding protein 4 gene</i>
<i>MTA-1</i>	<i>Metastasis associated 1 gene</i>
<i>MTF-1</i>	<i>Metal regulatory transcription fator 1 gene</i>
m/z	Razão massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
ndPHHF	Persistência hereditária de hemoglobina fetal não delecional
<i>PAX1</i>	<i>Paired box 1 gene</i>
PBS	Salina tamponada fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PHHF	Persistência hereditária de hemoglobina fetal
PV	Partículas virais
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
<i>QTL</i>	<i>Quantitative trait locus</i>
RNAi	RNA de interferência
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>

SCF	<i>Stem Cell factor</i>
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
<i>TAL1</i>	<i>T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1 gene</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	Trisaminometano
<i>TR2</i>	<i>Testicular receptor 2/nuclear receptor subfamily 2 group C member 1 gene</i>
<i>TR4</i>	<i>Testicular receptor 4/nuclear receptor subfamily 2 group C member 2 gene</i>
YAC	<i>Yeast artificial chromossome</i>
<i>YY1</i>	<i>Yin Yang 1 gene</i>

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Hematopoese.....	21
1.2. Eritropoese.....	24
1.3. Hemoglobinas e globinas.....	25
1.3.1. Distúrbios hereditários das hemoglobinas.....	29
A. Distúrbios de alterações estruturais.....	29
B. Redução no ritmo de síntese das cadeias globínicas.....	30
C. Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal.....	30
1.3.2. Regulação dos genes das globinas.....	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivos gerais.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. CASUÍSTICA.....	40
3.1. Critérios de inclusão.....	41
3.2. Critérios de exclusão.....	42
3.3. Aspectos éticos da pesquisa.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Separação de células CD34+.....	43
4.2. Cultura de células progenitoras eritroides humanas.....	43
4.3. Cultura de células das linhagens humanas K562 e KU812.....	45
4.4. Camundongos transgênicos β -YAC.....	45
4.5. Células de camundongos transgênicos β -YAC dependentes de CID.....	46
4.6. Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP).....	47
4.7. Nucleofecção e silenciamento gênico por <i>siRNA</i>	48
4.8. Transdução com lentivírus e silenciamento gênico por <i>shRNA</i>	48
4.9. Citospin e coloração de Leishman.....	51
4.10. Citometria de fluxo.....	51
4.11. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	51
4.12. Extração de RNA total.....	52

4.13.	Síntese de cDNA.....	53
4.14.	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	53
4.15.	Ensaio de proteção de ribonuclease (EPR).....	53
4.16.	Análise estatística.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	Caracterização dos camundongos transgênicos β -YAC.....	55
5.2.	Análise de ligação de fatores de transcrição no promotor do gene <i>HBG1</i> em células dependentes de CID.....	57
5.3.	Análise de ligação de fatores de transcrição no promotor do gene <i>HBG1</i> em células de fígado fetal de camundongos transgênicos β -YAC.....	59
5.4.	Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) em cultura primária de células eritroides.....	63
5.5.	Silenciamento gênico com partículas lentivirais em células K562 e KU812...65	
5.6.	Caracterização da nova cultura primária eritroide.....	67
5.7.	Silenciamento gênico por <i>siRNA</i> em cultura primária de células eritroides humanas.....	70
5.8.	Silenciamento gênico por partículas lentivirais contendo <i>shRNA</i> em cultura primária de células eritroides humanas.....	72
6.	CONCLUSÕES	76
6.1.	Estudos com camundongos transgênicos β -YAC.....	76
6.2.	Estudos in vitro com células humanas.....	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8.	APÊNDICE	88
9.	ANEXOS	97
9.1.	ANEXO I: Parecer consubstanciado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de ciências Médicas.....	97
9.2.	ANEXO II: Termos de consentimentos livre e esclarecido apresentados aos voluntários controles e portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal não-delecional tipo Brasileira.....	99
9.3.	ANEXO III: Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hematopoese

O sistema hematopoético é altamente regenerativo, com produção diária de cerca de um trilhão de células na medula óssea de seres humanos adultos (Doulatov et al., 2012). A hematopoese adulta é caracterizada por uma diferenciação hierárquica de linhagens celulares que produz, pelo menos, oito linhagens funcionalmente distintas de células sanguíneas diferenciadas: hemácias, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos B e T (Orkin e Zon, 2008; Figura 1). As células fundadoras desta hierarquia são as células-tronco hematopoéticas (HSCs) que, assim como todas as demais células-tronco, também têm a habilidade de se submeter à auto renovação. Assim, as HSCs são definidas por duas características fundamentais: a capacidade de auto renovação (geração de HSCs adicionais) e a multipotência, isto é, a capacidade de diferenciação em todas as linhagens celulares maduras circulantes no sangue (Hoggatt et al., 2016).

Em vertebrados, a produção de células-tronco sanguíneas é caracterizada pela alocação e especificação de células embrionárias distintas em uma variedade de locais que mudam durante o desenvolvimento (Galloway e Zon, 2003). Em mamíferos, os locais sequenciais da hematopoese incluem o saco vitelínico, uma área em torno da aorta dorsal denominada de região aorta-gônada-mesonefros (AGM), a placenta, migrando assim para o fígado fetal e, finalmente, a medula óssea. As propriedades das HSCs diferem em cada local, refletindo os diversos nichos de expansão e/ou diferenciação, e intrínsecas características das HSCs em cada estágio (e.g., as HSCs no fígado fetal estão em divisão celular, enquanto que as HSCs na medula óssea estão, em sua maioria, quiescentes).

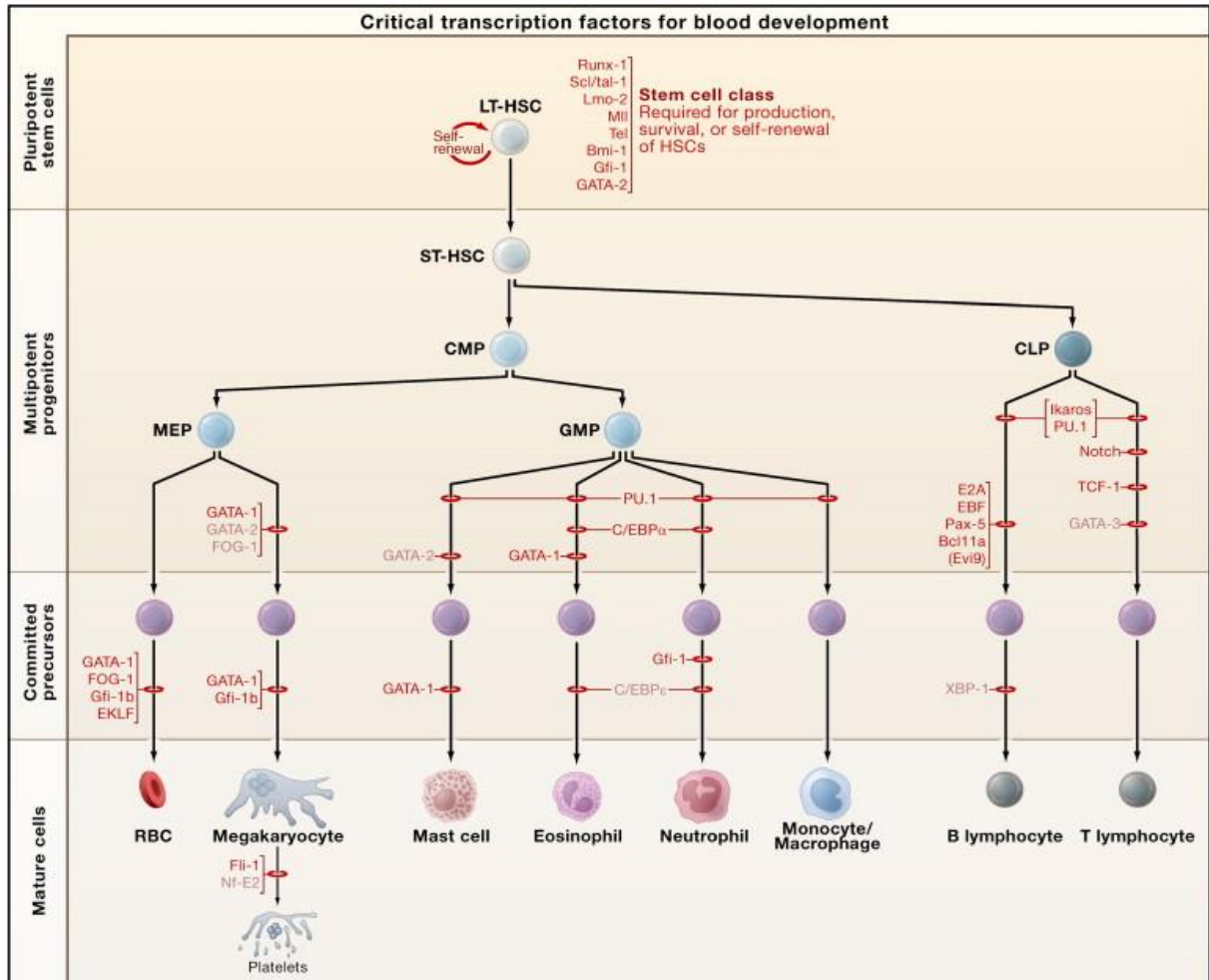


Figura 1. Hematopoese adulta e fatores de transcrição envolvidos nesse processo. Estágios da hematopoese e os diferentes tipos celulares característicos de cada um deles, até a geração das oito linhagens celulares maduras circulantes no sangue. Os estágios nos quais o desenvolvimento hematopoético é bloqueado na ausência de um determinado fator de transcrição estão indicados pelas barras vermelhas. Os fatores de transcrição apresentados em vermelho claro ainda não foram encontrados translocados ou mutados em malignidades hematológicas humanas ou murinas. LT-HSC, células-tronco hematopoéticas de longo prazo; ST-HSC, células-tronco hematopoéticas de curto; CMP, progenitor mieloide comum; CLP, progenitor linfóide comum; MEP, progenitor eritroide/megacariocítico; GMP, progenitor granulocítico/macrofágico; RBCs, hemácias (Adaptado de Orkin e Zon, 2008).

A produção de células sanguíneas em vertebrados ocorre em duas ondas hematopoéticas. A primeira onda, denominada “primitiva”, é caracterizada pela diferenciação de progenitores eritroides em eritrócitos e macrófagos durante o desenvolvimento embrionário inicial (Palis e Yoder, 2001). A função primária dessa primeira onda hematopoética é a produção de hemácias que facilitarão a oxigenação tecidual, uma vez que o embrião passa por rápido crescimento (Orkin e Zon, 2008). Em mamíferos e aves, esses progenitores eritroides aparecem primeiramente em ilhas de sangue no saco vitelínico no início do desenvolvimento (Paik e Zon, 2010). Essa onda primitiva é transitória, sendo

rapidamente substituída pela hematopoese adulta ou “definitiva”, e os progenitores eritroides produzidos nessa etapa não são pluripotentes e não têm capacidade de auto renovação. Na maioria dos organismos, há uma onda transiente da hematopoese definitiva que ocorre nas ilhas de sangue e produzem as chamadas células progenitoras eritroide-mieloide (EMPs) (McGrath et al., 2011; Bertrand et al., 2007). A hematopoese definitiva tardia envolve as HSCs definitivas, que, em camundongos, originam-se na região AGM no embrião em desenvolvimento, e logo depois são detectadas em outros tecidos como saco vitelínico, placenta e fígado fetal (Gekas et al., 2005; Kumaravelu et al., 2002; Ottersbach e Dzierzak, 2005). O fígado fetal não é capaz de gerar autonomamente as HSCs. Assim, as HSCs migram da região AGM, do saco vitelínico e da placenta para colonizar o fígado fetal, o qual torna-se o principal órgão hematopoético até o nascimento, quando a hematopoese é estabelecida na medula óssea (Kumaravelu et al., 2002). De forma análoga ao embrião de camundongo, o desenvolvimento hematopoético no embrião humano ocorre de maneira similar (Luis et al., 2012; Figura 2).

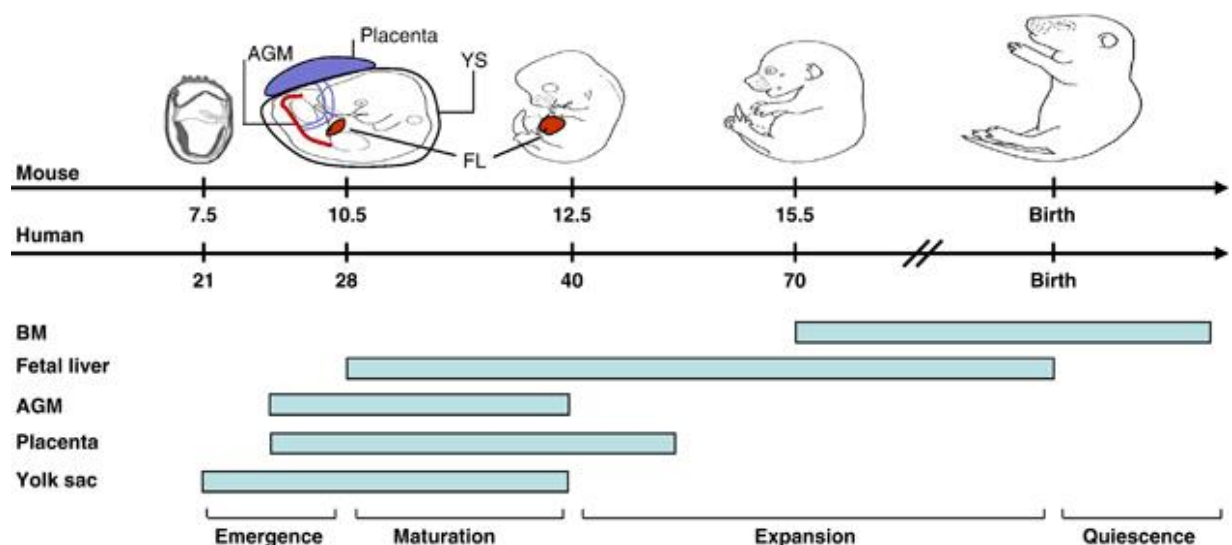


Figura 2. Estabelecimento das HSCs definitivas durante o desenvolvimento embrionário. As barras representam as idades nas quais os locais de hematopoese em camundongos e humanos estão ativos (Luis et al., 2012).

Como determinantes intrínsecos para o fenótipo celular, os fatores de transcrição fornecem as informações iniciais sobre como as HSCs se desenvolvem durante a embriogênese e como a diferenciação restrita a cada linhagem é programada (Orkin, 2000).

Dessa forma, é possível dividir os fatores de transcrição entre aqueles envolvidos na formação ou função das HSCs e aqueles envolvidos na diferenciação linhagem específica. Entre os fatores de transcrição envolvidos na formação e função das HSCs estão o MLL, Runx1, TEL/ETV6, SCL/tal1 e LMO2 (Orkin e Zon, 2008; figura 1). Alguns exemplos de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação linhagem específica, são GATA-1, envolvido na diferenciação eritroide, megacariocítica e eosinofílica e, PU-1, associado à diferenciação da linhagem mieloide (Figura1).

1.2. Eritropoese

Durante o desenvolvimento dos mamíferos, as primeiras células do sangue morfológicamente reconhecíveis no conceito são as da linhagem eritroide. A produção antecipada de células da linhagem eritroide no saco vitelino é necessário para o desenvolvimento do embrião de vertebrados.

Em mamíferos, a eritropoese definitiva ocorre primeiro no fígado fetal com células progenitoras provenientes do saco vitelínico (Palis et al., 1999). No fígado fetal e na medula óssea adulta, as células hematopoéticas são formadas continuamente a partir de uma pequena população de células-tronco pluripotentes que dão origem a progenitores comprometidos com uma ou poucas linhagens hematopoéticas (Figura 3). Os primeiros progenitores comprometidos com a linhagem eritroide identificados são as BFU-E (*burst forming unit-erythroid*) precoces. Essas, por sua vez, sofrem divisão e diferenciação para BFU-E maduras e, rapidamente, para CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*) (Elliott et al., 2008). As CFU-E dividem-se de três a cinco vezes por dois a três dias à medida que se diferenciam, passando por mudanças consideráveis, como diminuição no volume celular, condensação da cromatina e hemoglobinizacão, levando à extrusão do núcleo e de outras organelas (Fawcett, 1997).

Em humanos, o tempo de vida das hemácias é de 120 dias. Em condições normais, aproximadamente 1% dos eritrócitos totais são sintetizados diariamente. Todavia, a produção dessas células pode ser incrementada substancialmente em períodos de estresse agudo ou crônico, como trauma agudo ou hemólise (Hattangadi et al., 2011). O controle de curto prazo da eritropoese é bastante refinado e regulado pela eritropoetina (EPO), citocina produzida e liberada pelo rim em condições de hipóxia, a qual estimula a proliferação terminal e diferenciação dos progenitores das CFU-E (Molineux et al., 2009). As BFU-E

respondem à uma variedade de hormônios além da EPO, incluindo SCF (*stem cell factor*), IGF-1 (*insulin like growth factor 1*), glicocorticoides, e interleucinas 3 e 6 (IL-3 e IL-6) (Hattangadi et al., 2011). Esses hormônios continuarão a atuar nos processos posteriores de diferenciação eritroide sequencial, originado assim, os proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, reticulócitos e, por fim, as hemácias. A cada estágio de produção dos eritrócitos, proteínas intracelulares de transdução de sinal e fatores de transcrição ativados *downstream* a esses hormônios interagem com um grupo de fatores de transcrição e de modificadores de cromatina, bem como com diversos RNAs regulatórios não-codificantes, como os microRNAs (Figura 3). Muitos desses RNAs e proteínas são essenciais para determinar a função e/ou identidade de cada progenitor celular durante a eritropoese.

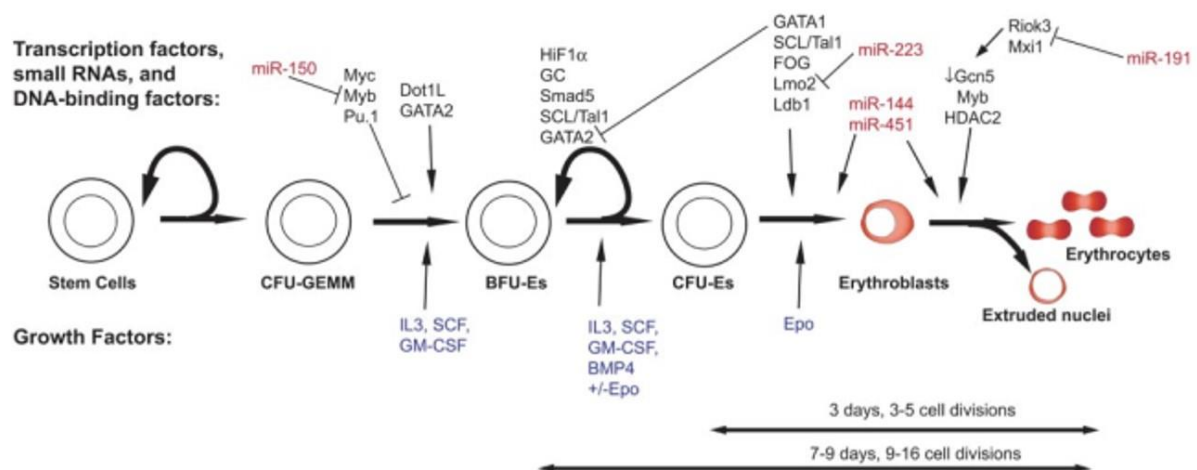


Figura 3. Esquema global da eritropoese: regulação em múltiplos níveis por múltiplas proteínas, hormônios e miRNAs. A formação das hemácias a partir das HSCs é regulada pela sinalização de fatores externos (em azul), como citocinas e fibronectina, bem como por fatores intracelulares como os fatores de transcrição (em preto) e miRNAs (em vermelho) (Adaptado de Hattangadi et al., 2011).

1.3. Hemoglobinas e globinas

A hemoglobina, uma metaloproteína que contém ferro, encontrada nas hemácias de todos os vertebrados, provê o mecanismo primário de transporte de oxigênio na circulação. A hemoglobina humana é uma molécula tetramérica composta por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β) (Bunn & Forget, 1986).

Cada cadeia possui um grupo prostético heme com um íon ferro em seu centro, o qual se liga reversível e não covalentemente a uma molécula de oxigênio, desempenhando a função de transporte de oxigênio e de gás carbônico aos tecidos (Perutz, 1983). É uma proteína alostérica, uma vez que a ligação e liberação do oxigênio são reguladas por mudanças na sua estrutura, decorrentes da ligação do oxigênio ao grupo prostético heme (Nussbaum et al., 2004).

A homologia inequívoca entre a sequência de aminoácidos e estrutura das globinas atuais indicam que essas devem ter se originado de um mesmo gene ancestral comum. A hemoglobina foi necessária para que animais multicelulares pudessem atingir grandes portes, uma vez que a simples difusão de oxigênio não seria capaz de oxigenar todos os tecidos adequadamente. Consequentemente, moléculas de hemoglobina ou similares são encontradas em todos os vertebrados e muitos invertebrados. A molécula carreadora de oxigênio mais primitiva encontrada em animais é uma cadeia globínica de aproximadamente 150 aminoácidos, encontrada em vermes marinhos, insetos e peixes primitivos. Contudo, a hemoglobina em vertebrados superiores é composta por dois tipos de cadeias globínicas. Esses dois tipos de cadeias globínicas, α e β , surgiram há aproximadamente 500 milhões de anos, durante a evolução dos peixes superiores, por eventos de mutações e duplicações. Nos vertebrados superiores, cada molécula de hemoglobina é composta por duas cadeias do tipo α e duas do tipo β (Figura 4). Mais tarde, durante a evolução dos mamíferos, o gene de β globina parece ter sofrido adicionais eventos de duplicação e mutação, originando a globina fetal, a qual apresenta maior afinidade ao oxigênio do que a hemoglobina adulta, auxiliando na transferência de oxigênio da mãe para o feto. Esse novo gene, por sua vez, passou por novos eventos de duplicação e mutação, dando origem aos genes das globinas ϵ e γ , expressos no período embrionário e fetal. Um novo evento de duplicação ocorrido durante a evolução dos primatas originou o gene da globina δ , somente encontrada em primatas adultos (Alberts et al., 2002).

Eventos de duplicação e mutação também ocorreram no cluster da globina α . E como os clusters globínicos α e β encontram-se em cromossomos separados em pássaros e mamíferos, mas estão no mesmo cromossomo em sapos *Xenopus sp.*, acredita-se tenha ocorrido um evento de translocação cromossômica que separou os dois clusteres por volta de 300 milhões de anos atrás (Figura 4). Esses eventos de mutação, duplicação e translocação estão sumarizados na figura 4.

Existem algumas sequências originadas da duplicação dos genes das globinas α e β que não são funcionais, e sim pseudogenes, que possuem alta homologia com os genes funcionais, porém foram inativados por mutações que impedem sua expressão (Figura 4).

Os genes das globinas foram modificados por mutações de ponto que afetaram tanto as propriedades da hemoglobina formada, bem como sofreram mudanças nas regiões regulatórias que determinam o nível e o tempo de expressão de cada gene. Por essa razão, cada cadeia globínica é expressa em níveis e momentos diferentes do desenvolvimento humano (Figura 5). No período embrionário, os genes ζ e ϵ são transcritos e seus respectivos polipeptídios formam a hemoglobina do tipo Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) (Hecht et al., 1966). Por volta da décima semana de gestação, o gene que expressa o polipeptídio da globina α passa a ser transcrito abundantemente, sendo expresso durante toda a vida, acarretando na formação da hemoglobina Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$). Além dessas, no período embrionário há a produção da hemoglobina Portland ($\zeta_2\gamma_2$), uma vez que o gene da globina γ também passa a ser expresso (Gale et al., 1979; Randhawa et al., 1984). Na fase fetal, há a predominância da expressão do gene da globina γ , levando à formação da hemoglobina fetal (HbF; $\alpha_2\gamma_2$) composta por 75% de cadeias γ^G e 25% de cadeias γ^A . Na fase adulta, a expressão do gene da globina β é abundante e as hemoglobinas dos tipos A (HbA; $\alpha_2\beta_2$) e A₂ (HbA₂; $\alpha_2\delta_2$) passam a ser formadas. Em indivíduos adultos, a HbA é predominante, correspondendo a mais de 95% do total de hemoglobinas, enquanto que a HbA₂ se mantém em níveis inferiores a 3,5% e a HbF é produzida em níveis inferiores a 1% (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos & Grosfeld 2001).

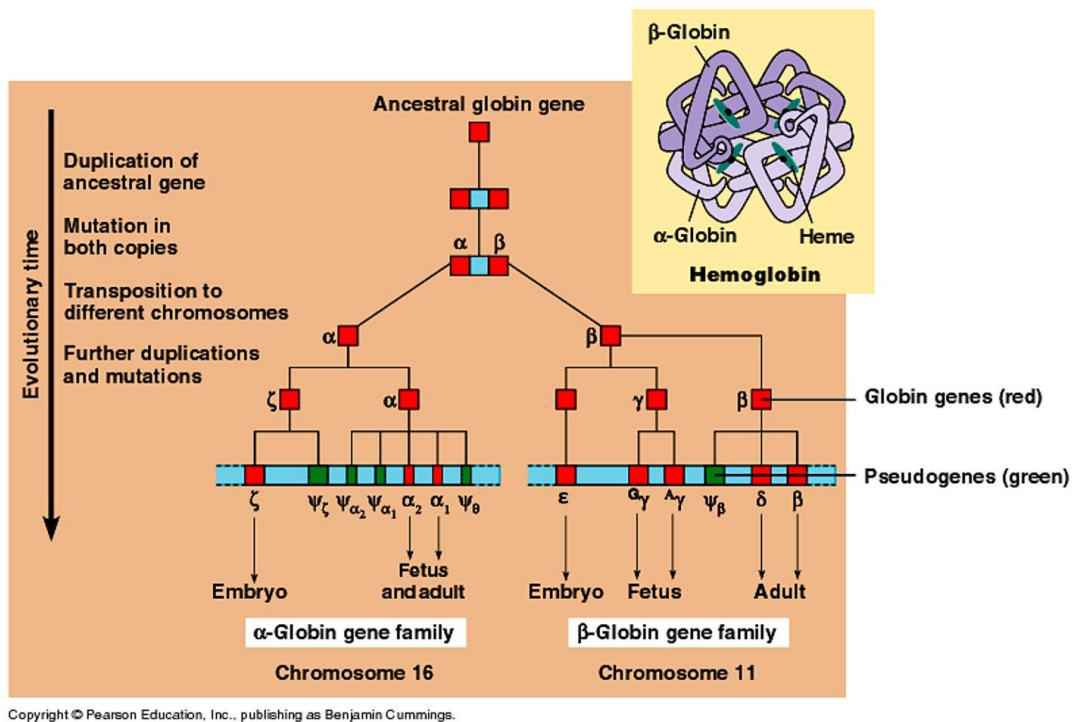


Figura 4. Eventos envolvidos na geração dos dois clusters de globinas humanas ao longo da evolução. Eventos de duplicação, mutação e translocação ocorreram, a partir de um gene de globina ancestral, para dar origem aos genes das globinas dos seres humanos: globinas do tipo α no cromossomo 16 e globinas do tipo β no cromossomo 11. Os genes das globinas estão representados pelos quadrados em vermelho e os pseudogenes em verde.

Durante o período de desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão dos genes responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobina (Dzierzak, 2001). Esse fenômeno é conhecido como *switching* de hemoglobina (Figura 5). O primeiro *switching* ocorre com a mudança de hemoglobina embrionária para fetal que acontece entre 6 e 8 semanas de gestação, e envolve o silenciamento dos genes das globinas embrionárias ϵ (*HBE*) e ζ (*HBZ*) no saco vitelínico e a ativação dos genes da globina fetal γ (*HBG1* – globina- γ^A e *HBG2* – globina- γ^G) no fígado. O segundo *switching* é caracterizado pelo progressivo silenciamento dos genes de globina- γ , com a concomitante ativação da expressão do gene de globina- β (*HBB*) na medula óssea que se completa após o nascimento (Amoyal & Fibach, 2007).

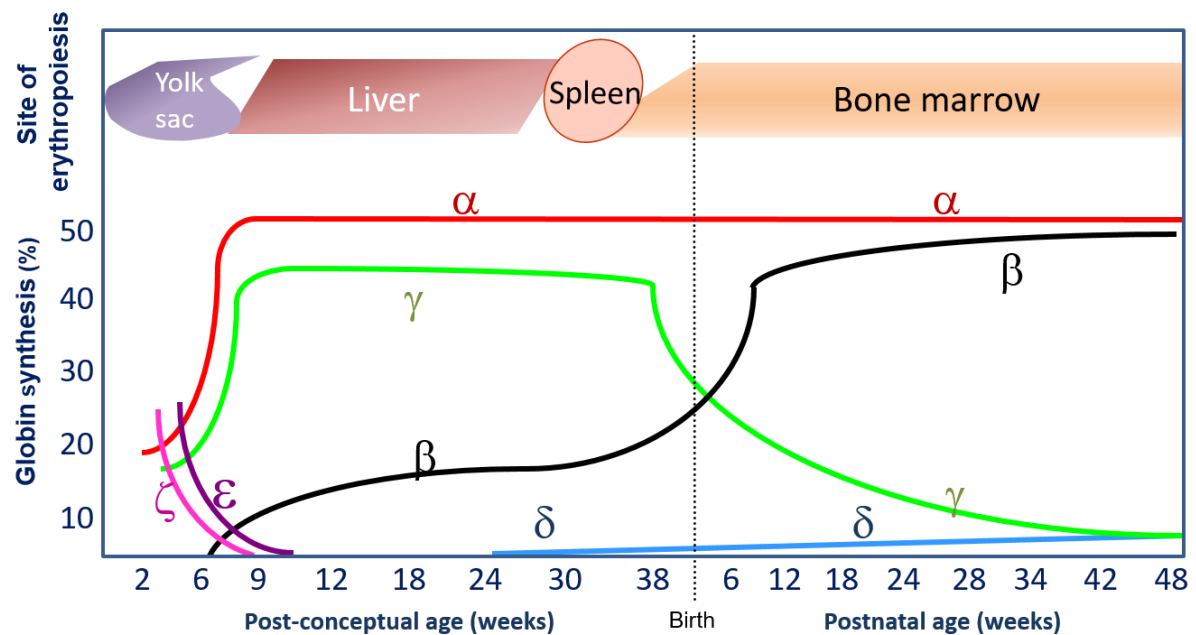


Figura 5. Produção das globinas durante o desenvolvimento ontogenético normal. Durante o período de desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem alterações na expressão dos genes responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas (Jorge et al., 2016).

1.3.1. Distúrbios hereditários das hemoglobinas

Os distúrbios das hemoglobinas podem ser classificados em 3 grupos: A) alterações estruturais, B) redução no ritmo de síntese das cadeias globínicas (talassemias alfa e beta) e C) as persistências hereditárias de hemoglobina fetal (Bradley & Ranney, 1973; Weatherall, 1977; Weatherall & Clegg, 1979).

A. Distúrbios de alterações estruturais

Dentre as variantes estruturais das hemoglobinas, a hemoglobina S (HbS) representa a mais importante e frequente. A HbS, hemoglobina anômala característica da anemia falciforme (AF), é uma variante mutante e estrutural da hemoglobina adulta (HbA), que ocorre devido à mutação de ponto A>T no códon 6 do gene *HBB*, levando à substituição de um ácido glutâmico por uma valina (Nagel e Platt, 2001). Em condições de hipóxia ou acidose, ocorre a polimerização da HbS que leva à formação de fibras dentro dos eritrócitos, resultando na morfologia falciforme dos eritrócitos, típica da AF. As hemácias falcizadas são a causa primordial do grave quadro clínico apresentado pelos pacientes com anemia

falciforme, que podem englobar episódios de vaso-oclusão, acidente vascular cerebral, úlcera de perna, síndrome torácica aguda, entre outros (Ferrone, 2004).

B. Redução no ritmo de síntese das cadeias globínicas

As síndromes talassêmicas, que compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias, são caracterizadas pela redução parcial ou total no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias globínicas. As síndromes talassêmicas podem ser classificadas, basicamente, em talassemias α e talassemias β , assim denominadas quando a alteração no ritmo de produção ocorre nas cadeias α e β , respectivamente (Weatherall, 1994).

O desbalanço na síntese de cadeias globínicas, uma vez que as cadeias globínicas não alteradas continuam a ser produzidas normalmente, é a principal causa das anormalidades dos eritrócitos nas síndromes talassêmicas, que afetam o tempo de vida dessas células e sua deformabilidade. No caso das talassemias- β , o relativo excesso das cadeias globínicas α não pareadas resulta no seu acúmulo e precipitação que, por diferentes vias, causam danos à membrana das células, conduzindo à degradação prematura dos eritroblastos na medula, eritropoese ineficaz, levando assim, à anemia. Dessa forma, esses pacientes comumente apresentam necessidade regular de transfusão sanguínea (Olivieri, 1999; Urbinati et al., 2006).

A sobrecarga de ferro é o principal responsável pelas morbidades dos pacientes talassêmicos, pois o acúmulo de ferro em órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, glândulas e pele, conduz a complicações como cardiomiopatia, cirrose hepática, hipogonadismo, entre outras complicações que podem levar ao óbito precoce (Westwood et al., 2005).

C. Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

Em seres humanos, os níveis de HbF passam a decrescer gradualmente após o nascimento, chegando a aproximadamente 1% entre 6 e 12 meses de vida. Contudo, alguns indivíduos apresentam uma condição denominada persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF), caracterizada pela elevada síntese de HbF durante a vida adulta (Forget 1998; Wood 2011). A PHHF é classificada em dois tipos: 1) deletional ou 2) não deletional. A PHHF deletional é marcada por extensas deleções (13 a 106 kb), que podem incluir de forma parcial ou total os genes *HBD* e *HBB* (Figura 6). O aumento da expressão dos genes *HBG1* e/ou *HBG2* e o consequente aumento dos níveis de HbF, estão associados à variável

compensação da redução parcial ou total da expressão dos genes *HBD* e/ou *HBB*. Essas deleções estão associadas à distribuição pancelar de HbF entre os eritrócitos.

As deleções PHHF-1 e PHHF-2 são as mais comuns em afrodescendentes. Essas deleções compreendem mais de 80 kb, incluindo os genes *HBD* e *HBB*. Heterozigotos para ambas as deleções apresentam níveis de HbF de 20 a 30% e moderada microcitose. Elas diferem entre si na proporção de cadeias γ^A e γ^G , sendo aproximadamente 50:50 na PHHF-1 e 30:70 na PHHF-2. Outras PHHFs deletoriais apresentam características hematológicas similares, com pequenas diferenças na proporção de cadeias γ^A e γ^G e nos níveis de HbA₂ quando o gene *HBD* não está deletado.

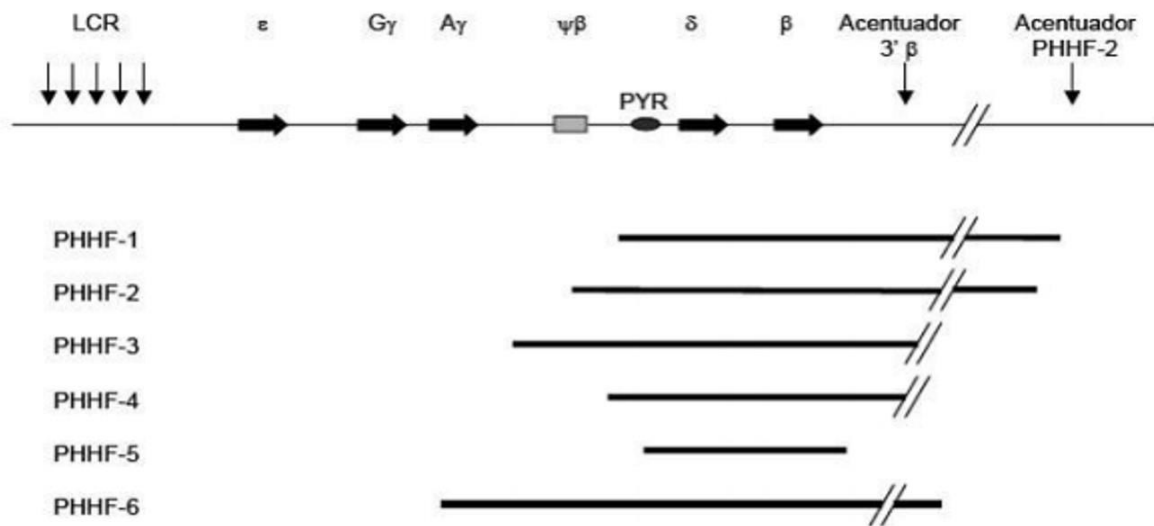


Figura 6. Tipos de PHHF deletoriais. Deleções gênicas identificadas no grupamento β, referentes às dPHHFs. As barras representam a extensão de cada deleção (Adaptado de Andrade, 2006).

A PHHF não deletorial (ndPHHF) pode ser uma condição de herança complexa causada por um dos três principais *quantitative trait loci* (QTL): 1) o sítio XmnI upstream do gene *HBG2* (cromossomo 11p15), 2) *BCL11A* (cromossomo 2p16) e, 3) o polimorfismo intergênico *HBS1L-MYB* (HMIP, cromossomo 6q23); ou pode ser herdada por herança Mendeliana, causada por mutações de ponto ou pequenas deleções nas regiões promotoras dos genes *HBG* (Akinsheye et al., 2012).

Indivíduos heterozigotos para PHHFs Mendelianas não-deletoriais apresentam níveis de HbF que variam de ~2 a ~40% (Tabela I). Contudo, os mecanismos que levam a esse aumento da expressão de HbF ainda não foram totalmente elucidados. Assim, as pesquisas

atuais têm focado na elucidação dos mecanismos envolvidos na manutenção ou reativação da expressão dos genes *HBG* pelo uso de drogas e terapia gênica.

Tabela I. Tipos de PHHF não deletoriais já descritas, com alterações nos genes *HBG1* e *HBG2* (Adaptado de Angastiniotis et al., 2013).

Mutação	Nomenclatura HGVS	Nome da variante de Hb	Fenótipo (% de HbF em heterozigose)	Origem
Gene <i>HBG2</i>				
-567 (T→G)	HBG2:c.-610T>G		5.9-10.2	Iraniana
-202 (C→G)	HBG2:c.-255C>G		14-21	Africana
-200 (+C)	HBG2:c.-253_254insC	Tunísia	18-28	Tunisiana
-196 (C→T)	HBG2:c.-249C>T		8.6	Grega
-175 (T→C)	HBG2:c.-228T>C		17-30	Africana
-114 (C→G)	HBG2:c.-167C>G	Australiana	8.6	Australiana
-114 (C→A)	HBG2:c.-167C>A	Argelina	0.6-3.5	Argelina
-114 (C→T)	HBG2:c.-167C>T	Japonesa	11-14	Japonesa
-110 (A→C)	HBG2:c.-163A>C	Tcheca	3.1	Tcheca
-109 (G→T)	HBG2:c.-162A>C	Grega	4.1	Grega
-37 (A→T)	HBG2:c.-90A>T		2.3	Holandesa
Gene <i>HBG1</i>				
-211 (C→T)	HBG1:c.-264C>T	Venezuelana	2.7-6.3	Africana
-202 (C→T)	HBG1:c.-255C>T		1.6-3.4	Africana
-201 (C→T)	HBG1:c.-254C>T		10.2	Grega
-198 (T→C)	HBG1:c.-251T>C	Inglesa	3.5-12	Inglesa
-196 (C→T)	HBG1:c.-249C>T	Italiana	14-21	Italiana, Chinesa
-195 (C→G)	HBG1:c.-248C>G	Brasileira	4.5-7.0	Brasileira
-175 (T→C)	HBG1:c.-228T>C	Negra	36-41	Africana
-158 (C→T)	HBG1:c.-211C>T	Grega	2.9-5.1	Grega
-117 (G→A)	HBG1:c.-170G>A	Grega	7.1-19	Grega, Italiana, Africana
-114 to -102 (13bp)	HBG1:c.-167_-155del CAATAGCCTTGAC	Deleção de 13pb da Geórgia	30-32	Africana
-114 (C→T)	HBG1:c.-167C>T		3-6.5	Africana

As mutações das PHHFs não-deletoriais Mendelianas incluem mutações de nucleotídeo único e pequenas deleções em três regiões dos promotores dos genes de globina-

γ : 1) posições -114 a -117; 2) -175; e 3) posições -195 a -202. Essas regiões coincidem com sítios de ligação à fatores de transcrição ubíquos e eritroide-específicos, o que parece ser a causa provável do incremento da expressão dos genes de globina- γ e consequente aumento nos níveis de HbF nos portadores dessas alterações (Wood, 2011; Giardine et al., 2011).

Indivíduos heterozigotos para essas mutações apresentam níveis variados de HbF, sendo as mutações na posição -175 associadas aos maiores níveis de HbF. Esses indivíduos apresentam características hematológicas normais, incluindo níveis de produção de células vermelhas e balanço na síntese de cadeias globínicas alfa e não-alfa.

A mutação de ponto T→C na posição -175, tanto no promotor do gene *HBG1* quanto no gene *HBG2* estão associados ao fenótipo pancelular de HbF. Essa região do DNA contém uma sequência de oito nucleotídeos na qual se liga o fator de transativação ubíquo OCT-1. Além disso, essa sequência consenso no gene *HBG1* é flanqueada por sequências consenso de ligação ao fator eritroide específico GATA-1. A mutação de ponto no sítio -175 afeta o nucleotídeo presente na região de sobreposição dos sítios de ligação aos fatores de transcrição OCT-1 e GATA-1 (McDonagh et al., 1991; Magis e Martin, 1995). Contudo, a relevância desses efeitos *in vitro* para o fenótipo de PHHF permanecem desconhecidos.

Nos genes da globina- γ , o CCAAT box, um conhecido elemento de regulação presente em diversos genes, está duplicado e a mutação da ndPHHF do tipo Grega (-117 G→A, no gene *HBG1*) está a duas bases de distância *upstream* do CCAAT box presente no promotor do gene da globina- γ^A . Essa mutação interrompe uma sequência pentanucleotídica YYTTGA (Y=pirimidina), imediatamente *upstream* da sequência CCAAT, altamente conservada nos genes fetal e embrionário em todos os animais. Essa mutação afeta a ligação dos fatores de transcrição GATA-1 e NFE-3 ao CCAAT box, bem como interrompe a ligação do fator de transcrição DR-1, associado ao silenciamento do gene de globina- γ (Filipe et al., 1999; Tanimoto et al., 2000).

Na ndPHHF tipo Brasileira, a mutação -195 C→G foi identificada na região promotora do gene *HBG1* por Costa e colaboradores em 1990, através do estudo de um paciente caucasóide portador de esferocitose hereditária e esplenectomizado, com níveis de HbF de 7% (13,9% de cadeias γ^G e 86,1% de cadeias γ^A). Dois irmãos desse paciente também apresentavam aumento de HbF (4,5% e 4,7%) com predomínio de cadeias γ^A sem, entretanto, serem portadores de esferocitose. Em 2003, Takahashi e colaboradores mostraram que esta única substituição C→G na posição -195 do gene *HBG1* é capaz de causar aumento da expressão do gene repórter da luciferase em três diferentes linhagens celulares (K562, HEL e

293), apenas na presença de parte do elemento de regulação HS2 do LCR (Takahashi et al., 2003). Através de análise de interação DNA–proteína, estes mesmos autores demonstraram que o aumento na síntese de HbF na ndPHHF-B não é mediado pela proteína Sp1 e nem cria um novo sítio CACCC *box* (Takahashi et al., 2003), diferentemente do que ocorre na ndPHHF tipo Inglesa (*HBG1*; -198 T→C) apesar de ambas apresentarem aumento similar nos níveis de HbF em indivíduos heterozigotos. Um estudo *in vivo*, com camundongos transgênicos portadores da mutação -195 C→G no gene *HBG1*, mostrou que essa mutação, em conjunto com todo o grupamento da globina β , é suficiente para elevar os níveis de HbF em todas as fases de desenvolvimento dos camundongos transgênicos em comparação aos camundongos portadores do grupamento da globina β selvagem (Cunha et al., 2009). Contudo, o mecanismo molecular específico envolvido na reativação do gene *HBG1* na ndPHHF tipo Brasileira ainda não está elucidado.

Em estudo anteriormente realizado no Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro de Campinas, foi observado que a presença da mutação C→G na posição -195 do promotor do gene *HBG1*, característica da PHHF não deletional tipo Brasileira, interrompe o sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição YY1, diminuindo a sua interação, e cria um novo sítio, o domínio central de ligação ao PAX1, permitindo sua interação com o promotor do gene *HBG1*, o que possivelmente reativa a expressão desse gene e aumenta a produção de HbF na fase adulta (Figura 7; Roversi, 2011). Estes resultados forneceram as primeiras evidências *in vitro* para o provável mecanismo molecular de reativação do gene *HBG1* na PHHF não deletional tipo Brasileira. Contudo, o papel destes fatores de transcrição na reativação de HbF ainda não está elucidado. Dessa forma, uma das propostas deste trabalho foi dar continuidade à avaliação do papel dos genes YY1 e PAX1 no processo de regulação da expressão do gene *HBG1* *in vitro*.

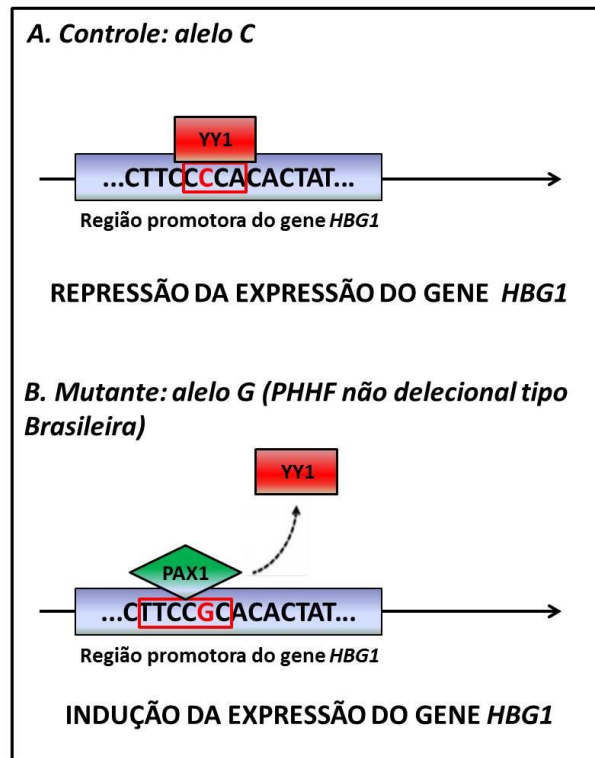


Figura 7. Representação esquemática do mecanismo molecular proposto para a reativação do gene *HBG1* na PHHF não deletional tipo Brasileira. (A) No promotor selvagem do gene *HBG1*, o fator de transcrição YY1 liga-se na sequência cis (CCAC) localizada entre as posições –195 e –192, reprimindo a expressão desse gene. (B) A presença da mutação de ponto C→G na posição –195 desse promotor, característica da PHHF não deletional tipo Brasileira, interrompe esse sítio de ligação ao DNA e cria um novo, TTCCGC, que é o domínio central de ligação do PAX1, permitindo a interação do PAX1 com o promotor do gene da *HBG1*, possivelmente reativando a expressão desse gene e aumentando a produção de HbF (Adaptado de Roversi, 2011).

O gene *Yin Yang 1* (*YY1*), com extensão de 40.270 pares de base (pb), está presente na região 14q32.2 (Yao et al., 1998) e é formado por cinco éxons altamente conservados. Por meio de *splicing* alternativo, o gene *YY1* humano codifica oito isoformas de proteínas diferentes. O *YY1* é um fator de transcrição ubíquo e multifuncional do tipo dedo de zinco (também conhecido como δ , NF-E1, UCRBP e CF1) e membro do grupo Polycomb (PcG) de proteínas, um grupo de genes receptores homeobox com papel crítico na hematopoese e controle do ciclo celular (Gordon et al., 2006).

O *YY1* tem papel fundamental nos processos biológicos normais como a embriogênese, e a diferenciação, replicação e proliferação celular, exercendo a função de iniciar, ativar ou reprimir a transcrição, dependendo do contexto em que se liga ao promotor dos genes envolvidos nesses processos (Gordon et al., 2006). Também já foi relatado que o

YY1 possa agir como repressor dos genes das globinas ϵ e γ (Zhu et al., 1999; Raich et al., 1995).

Os genes da família PAX (*paired box genes*) são altamente conservados e estão envolvidos no controle do desenvolvimento, codificando fatores de transcrição que atuam no padrão de formação durante a embriogênese dos vertebrados (McGaughran et al., 2003).

O *PAX1* (*paired box gene 1*), localizado na região 20p11.22 (Staplenon et al., 1993), estende-se por 12.828 pb e é formado por cinco éxons. Por *splicing* alternativo, este gene codifica duas isoformas de proteínas que diferem entre si na porção C-terminal. O gene *PAX1* de camundongos codifica uma sequência proteica específica de ligação ao DNA com propriedades de ativação da transcrição (Deutsch et al., 1988; Chalepakakis et al., 1991). Smith & Tuan (1994) detectaram a expressão de *PAX1* na coluna vertebral de fetos humanos com idade de sete a oito semanas, mas não nos fetos com dez a doze semanas de idade. Assim, os autores sugeriram que este gene possa ser importante na formação correta dos segmentos da coluna vertebral em humanos. Até o momento, não há relatos na literatura do envolvimento do gene *PAX1* na regulação de quaisquer genes das globinas ou em processos hematopoéticos/eritropoéticos.

1.3.2. Regulação dos genes das globinas

A regulação dos genes das globinas localizados no grupamento da globina β envolve a interação entre elementos regulatórios *cis*, que correspondem às sequências localizadas dentro, ao redor ou distantes dos genes, tais como promotores, acentuadores, silenciadores e fatores de transcrição (Bank, 2006). A expressão dos genes do grupamento β é controlada por uma região denominada *Locus Control Region* (LCR), formado por 5 sítios hipersensíveis à DNase I (HSs) distribuídos em uma região de 30 a 60 kb *upstream* do gene *HBB* (Figura 8). Estudos envolvendo ensaios de transientes e estáveis, bem como camundongos transgênicos, sugerem que o LCR não somente promove a transcrição gênica como também atua na atividade de abertura da cromatina (Bulger e Groudine, 1999). O LCR atua adaptando-se ao promotor de cada um dos genes, em períodos específicos do desenvolvimento, levando à formação de cada um dos tipos de hemoglobinas (Stamatoyannopoulos e Grosfeld, 2001). Os promotores dos genes das globinas ϵ , γ , δ e β diferem entre si na presença de sítios distintos para a ligação de proteínas regulatórias,

resultando na diferença de expressão desses genes durante os estágios de desenvolvimento humano normal (Forget, 2001).

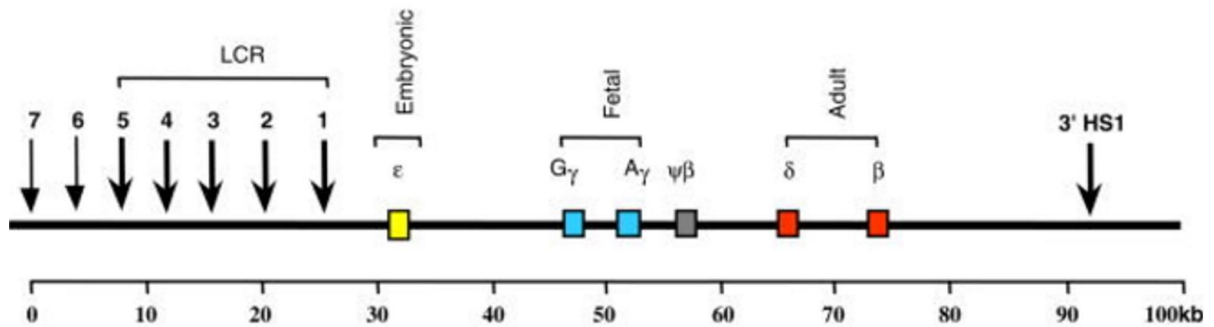


Figura 8. Diagrama do locus β humano. Disposição dos genes das globinas do tipo β , localização do LCR, formado por 5 regiões HSs, e o sítio HS1, localizado na porção 3' do cluster.

Muitos estudos têm demonstrado a relação de fatores de transcrição ubíquos ou estágio específicos no *switching* das globinas do grupamento β , indicando seu potencial como alvos terapêuticos no tratamento de hemoglobinopatias- β . Foi demonstrado que o fator de transcrição *B-cell CLL/lymphoma 11A* (*BCL11A*) age como um repressor da expressão de HbF, interagindo com inúmeros co-repressores no locus de globina- β levando a reconfiguração da cromatina nessa região (Xu et al., 2013; Sankaran et al., 2008). O *knockdown* de *Krüppel-like factor 1* (*KLF1*) induz a expressão de globina- γ em células progenitoras eritroides adultas humanas e murinas (Zhou et al., 2010). Uma vez que o gene *KLF1* é também um ativador direto de *BCL11A*, esse gene pode ter um papel crucial no *switching* de expressão de *HBG* para *HBB*, pela ativação direta de *HBB* e silenciamento indireto dos genes da globina- γ via ativação de *BCL11A* (Zhou et al., 2010). Além disso, muitas mutações no gene *KLF1* foram associadas ao aumento dos níveis de HbF (Borg et al., 2010 & 2011). A expressão forçada dos *orphan nuclear receptor TR2/TR4* aumentam a expressão de HbF em células eritroides adultas e melhoram muitas das características fisiopatológicas da AF em camundongos falciformes humanizados (Campbell et al., 2011). Ademais, muitas das mutações de PHHF direta ou indiretamente afetam a ligação de fatores de transcrição à região promotora dos genes *HBG*. Por exemplo, GATA-1 é um repressor constitutivo do complexo repressor GATA-1-FOG-1-Mi2 β que se liga aos motivos GATA - 567 globina- γ^G / -566 globina- γ^A (Harju-Baker et al., 2008; Costa et al., 2012b; Chen et al.,

2008). Mutações de ponto nesses sítios alteram os motivos de ligação ao GATA-1, aumentando os níveis de HbF in vitro e in vivo (Harju-Baker et al., 2008; Costa et al., 2012b; Chen et al., 2008).

Dessa forma, o presente estudo tem como intuito elucidar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na PHHF não deletional. Os estudos da regulação gênica em modelos animais e células em cultura eritroide são de grande importância para a melhor compreensão da eritropoese e do *switching* de hemoglobina, podendo auxiliar no desenvolvimento de novas terapias baseadas na reativação do gene *HBG1* que possam ser empregadas no tratamento das hemoglobinopatias- β .

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Estudar os genes potencialmente envolvidos na regulação do gene *HBG1* na PHHF não deletional

2.2. Objetivos específicos

- Na ndPHHF tipo Brasileira:
 - ✓ Avaliar o papel do fator de transcrição YY1 como possível repressor da expressão do gene *HBG1*
 - ✓ Avaliar o papel do fator de transcrição PAX1 como possível ativador da expressão do gene *HBG1*
- Analisar os fatores de transcrição YY1, PAX1, GATA-1, TAL1, LDB1, MTF-1, Mi2, MTA1, LRF, FOG1 e LMO2 que potencialmente se ligam à região promotora do gene *HBG1* nas mutações de PHHF -117 G→A (tipo Negra), -175 T→C (tipo Grega) e -195 C→G (tipo Brasileira) comparadas com o promotor tipo selvagem em fígado fetal de camundongos β -YAC com 12 e 18 dias pós-concepção (E12 e E18) e em células dependentes de CID derivadas desses animais.

3. CASUÍSTICA

Para identificação dos tipos de hemoglobinas presentes em amostras de sangue de doadores é realizada, rotineiramente, no Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da UNICAMP, a eletroforese de hemoglobina sob condição alcalina, usando acetato de celulose. Nas amostras selecionadas, isto é, com concentração elevada de HbF evidenciada na eletroforese, foi realizada quantificação da porcentagem de HbF por HPLC, usando o programa *α -Thalassemia Short Program* (VARIANT™, Bio-Rad Laboratories, EUA). Para indivíduos com aumento significativo nos níveis de HbF, característica dos portadores de PHHF, a porcentagem de HbF é superior a 1%, e de HbA2 inferior a 3,5%. Os indivíduos controle apresentam porcentagem de HbF inferior a 1%, e de HbA2 inferior a 3,5%. O genótipo dos portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira foi determinado por PCR e sequenciamento direto. Um fragmento de 319 pb do promotor do gene *HBG1* (posição -5 a -324pb) foi amplificado usando primers desenhados numa região não homóloga ao gene *HBG2* (*HBG1* direto 5'-CTCTATGATGGGAGAAGGAACTAG-3' e *HBG1* reverso 5'-AACTGCTGAAGGGTGCTTCC-3'). A determinação do genótipo foi feita através da análise do eletroferograma gerado após sequenciamento, utilizando-se o programa FinchTV (Geospiza, EUA) e comparadas com as sequências normais do gene por meio do BLAST no servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Foram selecionados seis indivíduos para este estudo, sendo três portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira e três indivíduos controle, no setor de doação de sangue do Hemocentro da UNICAMP.

Na tabela II estão apresentados os índices hematimétricos, que estão dentro da normalidade, dos portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira.

Tabela II. Índices hematimétricos dos 3 portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira incluídos nesse estudo.

Identificação	HbF (%)	HbA2 (%)	HCT (%)	HGB (%)	RBC (10 ⁶ cel/uL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)
PHHF 1	9,05 ± 0,55	2,45 ± 0,05	50,00 ± 0	16,75 ± 0,25	5,14 ± 0,04	97,20 ± 0,70	32,50 ± 0,30	13,15 ± 0,25
PHHF 2	10,55 ± 0,05	2,05 ± 0,15	46,25 ± 2,25	15,60 ± 0,20	5,00 ± 0,11	92,20 ± 2,2	31,15 ± 0,35	12,00 ± 0,2
PHHF 3	14,15 ± 0,45	2,15 ± 0,05	46,25 ± 7,45	15,35 ± 1,75	4,82 ± 0,69	95,80 ± 1,90	31,95 ± 0,85	11,90 ± 1,00

Para a seleção dos indivíduos incluídos nesse estudo, foi realizado sequenciamento do DNA genômico da região promotora do gene *HBG1*. Na figura 9 estão apresentados os eletroferogramas do sequenciamento desta região genômica de um indivíduo controle e de um indivíduo com PHHF não deletional tipo Brasileira, com a mutação -195 C→G em heterozigose.

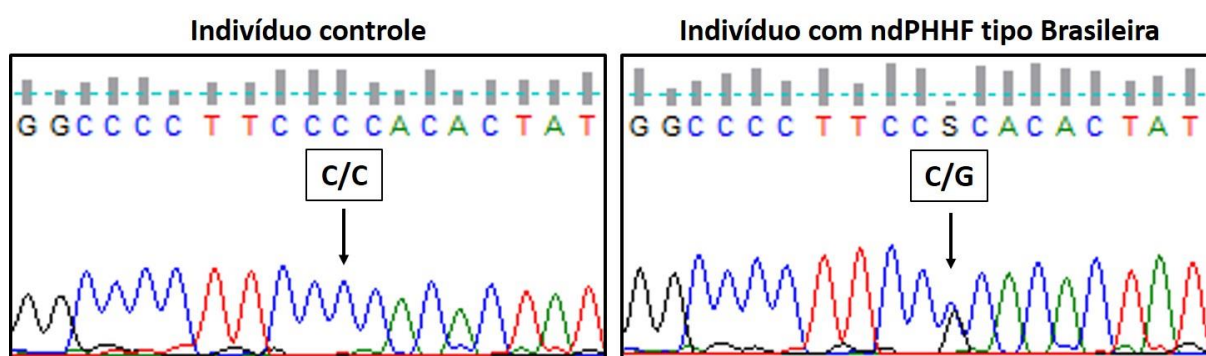


Figura 9. Eletroferograma do sequenciamento do gDNA. À esquerda, a sequência de gDNA de um indivíduo controle, homozigoto para o alelo C. À direita, está a sequência de gDNA do indivíduo com PHHF não deletional tipo Brasileira, portador da mutação -195 C→G em heterozigose na região promotora do gene *HBG1*. A seta indica a posição -195 no promotor do gene *HBG1*.

Na tabela III estão apresentados os índices hematimétricos, que se encontram dentro da normalidade, dos indivíduos controle recrutados para esse estudo.

Tabela III. Índices hematimétricos dos 3 indivíduos controle incluídos nesse estudo.

Identificação	HbF (%)	HbA2 (%)	HCT (%)	HGB (%)	RBC (10 ⁶ cel/uL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)
CTRL 1	0,1	2,7	43,7	14,6	5,18	84,4	28,2	13,1
CTRL 2	0,6	2,7	41,2	14,2	4,55	90,6	31,2	10,4
CTRL 3	0,2	2,9	48,1	16,2	5,71	84,2	28,4	13,8

3.1. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão para participação no estudo são:

- Para portadores de PHHF não deletional tipo Brasileira:

- ✓ Presença da mutação na posição -195 C→G do promotor do gene *HBG1*, com consequente aumento nos níveis de HbF;
- ✓ Índices hematimétricos normais.
- Para controles:
 - ✓ Ausência da mutação na posição -195 C→G do promotor do gene *HBG1*;
 - ✓ Níveis normais de HbF (até 1,0%);
 - ✓ Índices hematimétricos normais.

3.2. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para participação no estudo para ambos os grupos são:

- ✓ Indivíduos portadores de hemoglobinopatias ou quaisquer outras alterações hematológicas.

3.3. Aspectos éticos da pesquisa

O protocolo de pesquisa segue as determinações estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde (resoluções 196/96 e 340/04) e possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob o nº 254.694.

Os pacientes selecionados para o estudo são informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. Os indivíduos que aceitarem participar da pesquisa deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Separação de células CD34+

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo heparina lítica e processadas imediatamente após a coleta. As amostras foram posteriormente diluídas (na proporção 1:2; v:v) em solução PBS+BSA+ACD e colocadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Suécia) por 30 min. A camada de células mononucleares da interface do gradiente foi coletada e o isolamento das células CD34+ foi realizado utilizando o kit *Indirect CD34 Progenitor Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotech Inc., EUA).

4.2. Cultura de células progenitoras eritroides humanas

As células CD34+ foram cultivadas em meio de cultura eritroide MSSe, que é composto pelo meio *Iscoe's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM; Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Invitrogen), alfa-tioglicerol (Sigma Aldrich, EUA), 0,01% fungizona (Invitrogen), 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen). A cultura foi suplementada com 30 ng/mL de interleucina-3 (IL-3; R&D Systems, EUA), 2 U/mL de eritropoetina (EPO; Vetter Pharma Fertigung GmbH, Alemanha), 10% de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen) e 50 ng/mL de *stem cell factor* (SCF; R&D Systems), à 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 7 dias (Fase I). Após esse período as células foram transferidas para o meio de Fase II, em meio eritroide (MSSe) suplementado com 30% de FBS, 2 U/mL de EPO, 30 ng/mL de IL-3 e 50 ng/mL de SCF e cultivadas por mais seis dias. A caracterização das células desse método de cultura está apresentada na figura 10.

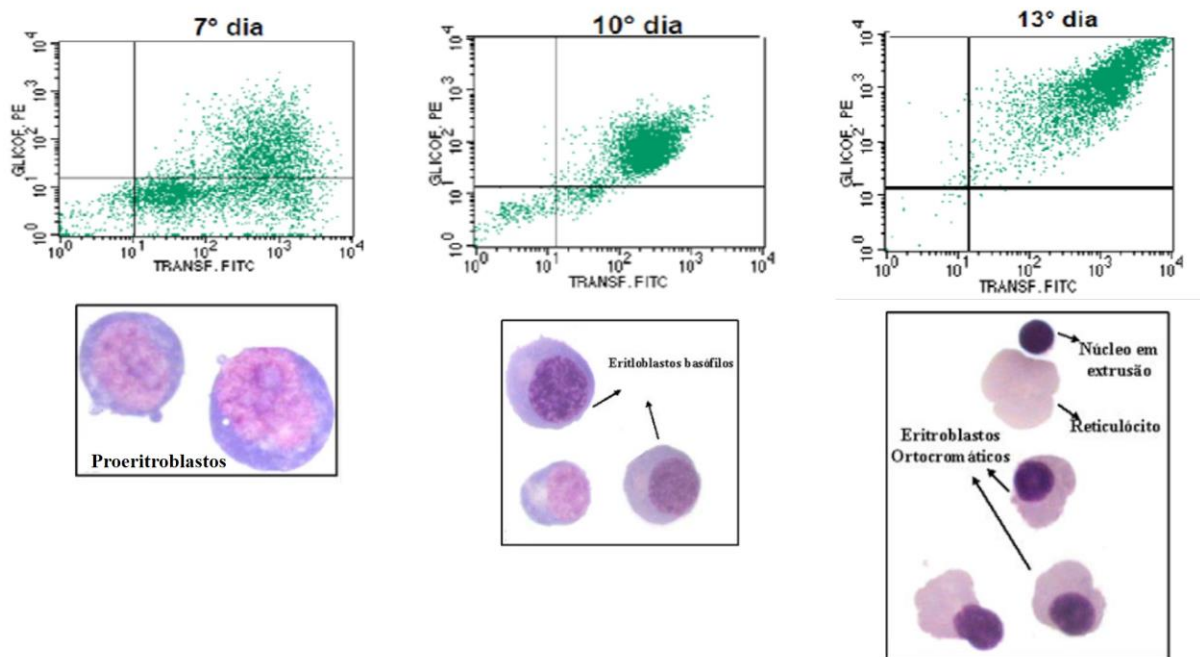


Figura 10. Maturação eritroide das células coletadas nos dias 7, 10 e 13 de cultura de células progenitoras eritroides humanas. Os *dot plots* de citometria de fluxo, mostram no eixo das abscissas a marcação anti-receptor de transferrina (marcador de células eritroides jovens) e o eixo das ordenadas a marcação anti-glicoforina A (marcador de células eritroides maduras). O quadrante superior direito indica marcação dupla para ambos os anticorpos. No 7º dia de cultura, há a presença de proeritroblastos. Nas amostras coletadas no 10º dia de cultura, observamos a presença de eritroblastos basófilos (indicados pelas setas). Já no 13º dia de coleta, encontramos eritroblastos ortocromáticos, reticulócitos e núcleo em extrusão (Adaptado de Lanaro, 2007)

Para os ensaios de transdução, como é necessário um grande número de células, outro método de cultura, com duas fases, sendo a primeira a fase de expansão e a segunda de diferenciação, foi padronizado. As células CD34⁺ foram cultivadas de acordo com Mahajan e colaboradores (2009) no meio de expansão (Fase I) StemSpan™ SFEM (StemCell Technologies, EUA) suplementado com StemSpan™ CC100 (StemCell Technologies) por sete dias. As células então foram transferidas para o meio de diferenciação (Fase II) em meio StemSpan™ SFEM suplementado com 20 ng/mL de SCF, 5ng/mL de IL-3, 2μM de dexametasona, 0,2 μM de estradiol e 2 U/mL de EPO em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram mantidas na concentração de 0.5 a 0.65x10⁶ células/mL de meio de cultura.

4.3. Cultura de células das linhagens humanas K562 e KU812

Culturas contendo 1×10^7 células por 75 cm^2 das linhagens celulares humanas eritroleucêmicas K562 e KU812 obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) foram mantidas em garrafas com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), para as células K562, ou *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI), para as células KU812, suplementados com 10% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina e 0,01% fungizona em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO_2 .

4.4. Camundongos transgênicos β -YAC

Os camundongos transgênicos β -YAC foram gerados utilizando cromossomo artificial de levedura (*yeast artificial chromosome*, YAC) contendo 213 Kb do locus da β -globina humana. Esse YAC contém um inserto de 187 Kb humano contendo os 82 Kb da sequência completa do locus de globina- β , abrangendo desde a região 5'HS4 do LCR até a região 3'HS1, aproximadamente 20 Kb *downstream* do gene da globina- β (Figura 11). A transformação dos camundongos foi realizada pela recombinação homóloga “*pop-in*”, “*pop-out*” em levedura, rastreamento dos clones positivos de leveduras, purificação dos YACs, transgenia em camundongos, e análise estrutural e determinação de número de cópias dos transgenes nos YAC (Costa et al., 2012b). O plasmídeo integrativo de levedura (*yeast-integrating plasmid*, YIP) pRS406 contendo um fragmento de 5.4 Kb do gene de globina- γ *SspI*-marcado (γ^m) (GenBank file U01317, coordenadas 38,683-44,077) foi mutado utilizando o *Quick Change Site-Specific Mutagenesis Kit* (Stratagene, EUA) para introduzir as mutações -117 G→A PHHF-tipo Grega, -175 T→C PHHF-tipo Negra ou -195 C→G PHHF-tipo Brasileira. A presença das mutações foi confirmada por análise da sequência de DNA de fragmento amplificado por PCR contendo a região da mutação.

Fígados de fetos de 12 e 18 dias pós-concepção (E12 e E18) foram dissecados e suspensões de células únicas foram preparadas para os experimentos de imunoprecipitação de cromatina.

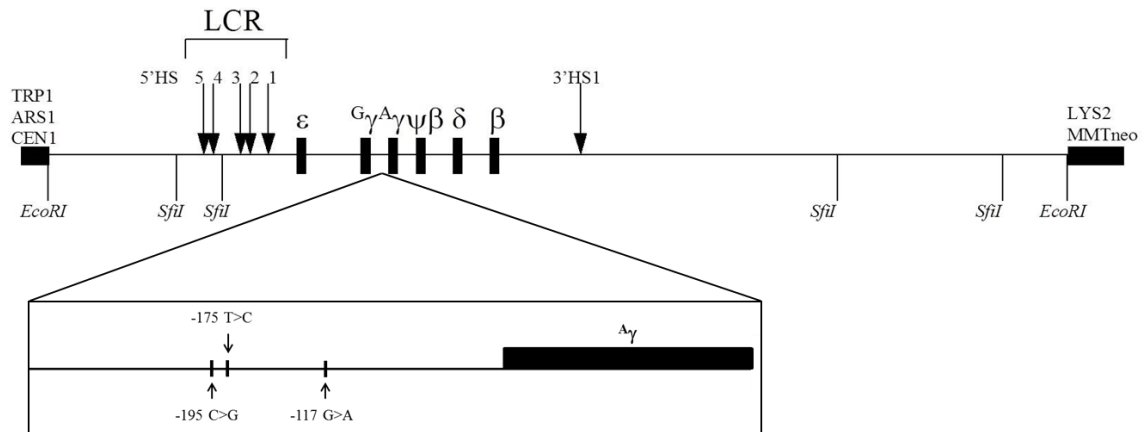


Figura 11. Locus de globina- β humano de 213 kb, inserido em cromossomo artificial de levedura (β -YAC). *Upstream* ao gene *HBE* (globina- ϵ) está localizado o LCR, definido como um set de quatro sítios eritroide específicos hipersensíveis a DNase I (5' HS). Outra região HS, denominada 3' HS1, está presente à ~20 kb da região 3' do gene *HBB* (globina- β). Também estão presentes nesse construto, o gene TRP1 de levedura, origem de replicação, ARS1 (sequência de replicação autônoma), um centrômero, CEN1, o gene LYS2, e um cassete marcador de seleção de mamífero, MMTneo, que codifica G418. Dois sítios de restrição para a enzima *EcoRI* e quatro para a *SfiI* relevantes na geração e caracterização estrutural desse YAC estão indicados. No quadro expandido do mapa do YAC, estão especificadas a posição e a troca de nucleotídeos das mutações de PHHF incluídas nesse estudo.

4.5. Células de camundongos transgênicos β -YAC dependentes de CID

Camundongos transgênicos β -YAC com a sequência controle e com as mutações -117 G→A, -175 T→C e -195 C→G foram usados para a geração das células de medula óssea (Blau & Peterson, 2006). A substância 5-fluorouracil (150 mg/kg) foi injetada intraperitonealmente nos camundongos transgênicos β -YAC e após 48 h, as células da medula óssea foram coletadas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 16% de FBS (Hyclone; EUA), 5% IL-3 murina (Peprotech; USA), 100 ng/mL de IL-6 humana (Peprotech), e 50 ng/mL de SCF murino (Peprotech) a 37°C em atmosfera úmida e 5% CO₂. Após esse período de pré-estímulo, as células foram transferidas para células GPE86 (irradiadas a 1,500 centigrays) produtoras de retrovírus, contendo F36V-modificado derivado de FKBP12 fusionado à porção intracelular do receptor mpl de trombopoetina, bem como o gene de resistência a neomicina controlado separadamente pelo promotor de fosfoglicerato quinase (PGK) (Jin et al., 1998). As transduções foram realizadas utilizando os mesmos fatores de crescimento do pré-estímulo, com a adição do polibreno (8 ug/mL; Sigma). Após 48 h, as células foram lavadas e colocadas em cultura na presença do indutor químico de dimerização

(*chemical inducer of dimerization*, CID) AP20187 (100 nmol/L; Ariad Pharmaceuticals, EUA) em IMDM suplementado com 10% de FBS e penicilina/estreptomicina. Na presença do CID, homodímeros são gerados e o sinal de proliferação gerado mantém a população de células indefinidamente, contanto que o CID esteja presente (Figura 12).

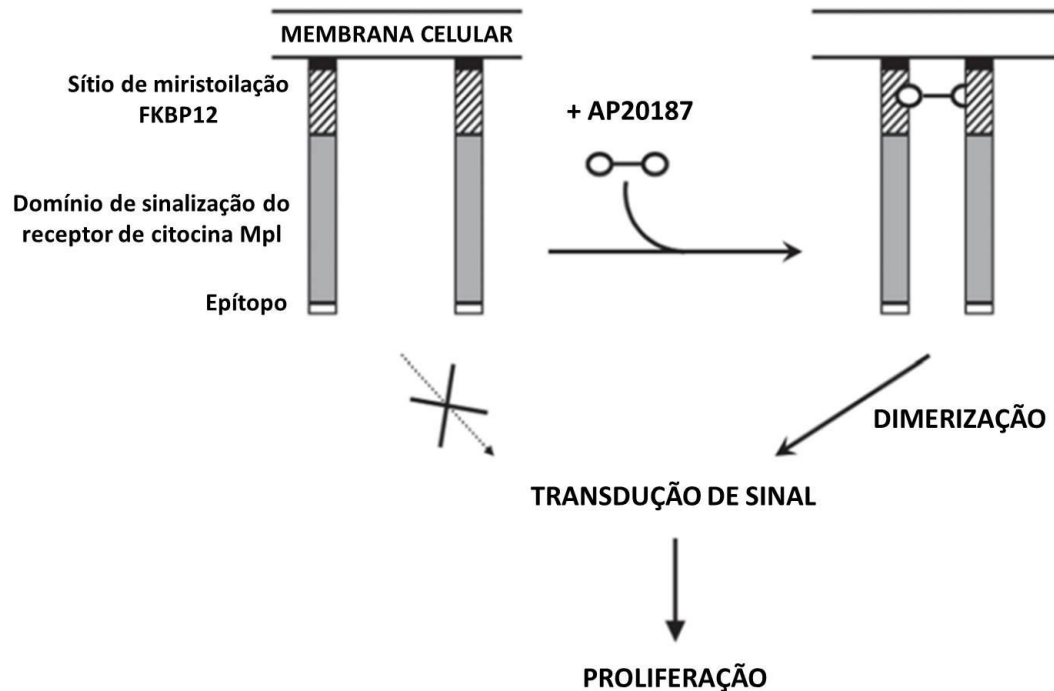


Figura 12. Tecnologia de dimerização utilizada para estabelecer as populações proliferativas de células dependentes de CID. O sinal de proliferação é ativado pela adição do indutor químico de dimerização (CID AP20187). O CID AP20187 catalisa a dimerização ligando-se aos domínios de dimerização (FKBP12) nas moléculas vizinhas. A dimerização produz um sinal de proliferação proveniente das sequências dos receptores homodimerizados (domínio de sinalização do receptor de citocina Mpl). Nesse sistema também está presente o domínio de miristoilação derivado do protooncogene c-src, que encaminha as moléculas para membrana celular interna, e um epítipo que pode ser utilizado para estudos de expressão e localização celular utilizando anticorpo epítipo-específico (adaptado de Blau & Peterson, 2006).

4.6. Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)

Células progenitoras eritroides primárias humanas, células dependentes de CID e suspensões de células únicas de fígado fetal de 12 e 18 dias pós-concepção (E12 e E18) de camundongos transgênicos β -YAC tipo selvagem e com as mutações -117 G→A HPFH, -175 T→C HPFH e -195 C→G HPFH β -YAC foram utilizados nesse experimento. O *cross-link* das proteínas nucleares com o DNA foi realizado pela incubação com paraformaldeído

1% por 10 min a temperatura ambiente. A reação foi parada com adição de glicina 125 mM e a cromatina foi sonicada em fragmentos entre 200 e 1000 pb. Assim, procedeu-se para a imunoprecipitação utilizando os anticorpos contra os fatores de transcrição YY1, PAX1, GATA-1, TAL1, LDB1, MTF-1, Mi2, MTA1, LRF, FOG1 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e LMO2 (R&D Systems, EUA) e os anticorpos de controles isotipos de imunoglobulina G (IgG; Santa Cruz Biotechnology), *overnight* a 4°C. As amostras de cromatina foram então incubadas por 4 h a 4°C com as *beads* magnéticas. Os imunoprecipitados foram lavados, o *cross-link* foi revertido e o DNA genômico foi purificado pelo método de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O recrutamento dos fatores de transcrição foi acessado por qPCR, utilizando par de primers específicos para a região promotora do gene de globina- γ (*HBG1* direto 5'-AAACTGGAATGACTGAATCGG-3' e *HBG1* reverso 5'-GGAGTTTAGCCAGGGACCG-3').

4.7. Nucleofecção e silenciamento gênico por *siRNA*

Para cada nucleofecção com *siRNA* (*Trilencer-27 Human siRNA*; Origene), contendo 3 duplexes de *siRNA* de 27 mer contra o YY1 RNAm, foi incluído um grupo controle transfectado com o *siRNA* controle *scrambled* (*Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control siRNA Duplex*, Origene). As nucleofecções foram realizadas em células progenitoras eritroides humanas, no dia 11 de cultura, utilizando o *Human CD34 Cell Nucleofector® Kit* (Lonza, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, no equipamento *Nucleofector™ 2b Device* (Lonza) com o programa U-008. O plasmídeo pMaxGFP (1 ug) foi incluído para monitorar a eficiência de transfecção. Depois da nucleofecção, as células foram cultivadas no meio de cultura de fase II por mais três dias e amostras foram coletadas para análise 48h e 72h pós-transfecção (Liu et al., 2013). Na figura 13, está a representação esquemática da via de processamento de *siRNA* em mamíferos.

4.8. Transdução com lentivírus e silenciamento gênico por *shRNA*

Para a transdução do plasmídeo contendo a molécula interferente para os genes de interesse por meio de lentivírus foi utilizado o kit *shRNA (h) Lentiviral Particles* (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) em cultura de células das linhagens eritroleucêmicas K562 e KU812. As partículas lentivirais estão prontas para o silenciamento do gene de interesse, pois

são providas de 3 a 5 construções plasmidiais com inserto de sequências-alvo específicas. Tais insertos são formados por 19 a 25 nucleotídeos para o silenciamento do gene de interesse. Na figura 13, está a representação esquemática da via de processamento de *shRNA* em mamíferos. Da mesma forma, as partículas controle apresentam o mesmo plasmídeo, porém sem o inserto interferente. Para o processo de transdução foi utilizado o meio DMEM ou RPMI (Gibco BRL Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de FBS e o reagente polibreno (3 µg/mL), para a melhor interação entre as partículas virais e as células, e foi feita a espinoculação. Assim, as células foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂, e em seguida lavadas para remoção das partículas virais livres e do polibreno. As células então foram ressuspensas em 500 µL de meio de cultura, sendo deixadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 72 h. Após esse período, a seleção das células transduzidas foi iniciada com adição de puomicina a 2 µg/mL no meio de cultura.

Para as células CD34⁺, a transdução foi realizada de acordo com Lee e colaboradores (2015), utilizando tanto com as partículas lentivirais comerciais *MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles* (Sigma Aldrich) como com lentivírus produzidos com vetores pGFP-C-shLenti (Origene, EUA), ambos contendo o gene repórter GFP (*green fluorescent protein*) e o gene de resistência à puomicina. No dia 3 de cultura, 300.000 células foram ressuspensas na concentração de 2.000 células/µL no meio de cultura da fase I contendo as partículas lentivirais (MOI entre 5 e 15). Depois de 24 h, as células foram ressuspensas em 4 mL do meio de cultura da fase I contendo 0,7 µg/mL de puomicina. No dia 7 de cultura, as células foram transferidas para o meio de cultura de fase II, sem adição de puomicina, e mantidas nessas condições até o 14 dia.

Nesses experimentos, para cada transdução, foram incluídos um grupo de células transduzidas com partículas lentivirais contendo shRNA com sequência que tenha como alvo nenhum gene em mamíferos (sequência *scrambled*), um grupo transduzido com partículas virais vazias, ou seja, sem nenhuma sequência de shRNA, e um grupo controle para seleção da puomicina, com células não transduzidas. A morte total desse último grupo foi avaliada por coloração de azul de Tripán (0,4% w/v, Gibco) para que a seleção de puomicina fosse comprovada.

Para verificar se somente a diminuição da interação do fator de transcrição YY1 é suficiente para aumentar os níveis transcricionais de *HBG1* e, assim, aumentar a produção de HbF, ou se também é necessária a interação de PAX1 no promotor do gene *HBG1* para reativá-lo, o silenciamento foi realizado da seguinte forma:

- Em células CD34⁺ de indivíduos controle:
 - ✓ Silenciar o gene *YY1* para verificar se há aumento da expressão de *HBG1* e produção de HbF, como observado na PHHF não deletional tipo Brasileira.
- Em células CD34⁺ de indivíduos com PHHF não deletional tipo Brasileira:
 - ✓ Silenciar o gene *PAX1* para verificar se há diminuição da expressão de *HBG1* e da produção de HbF.

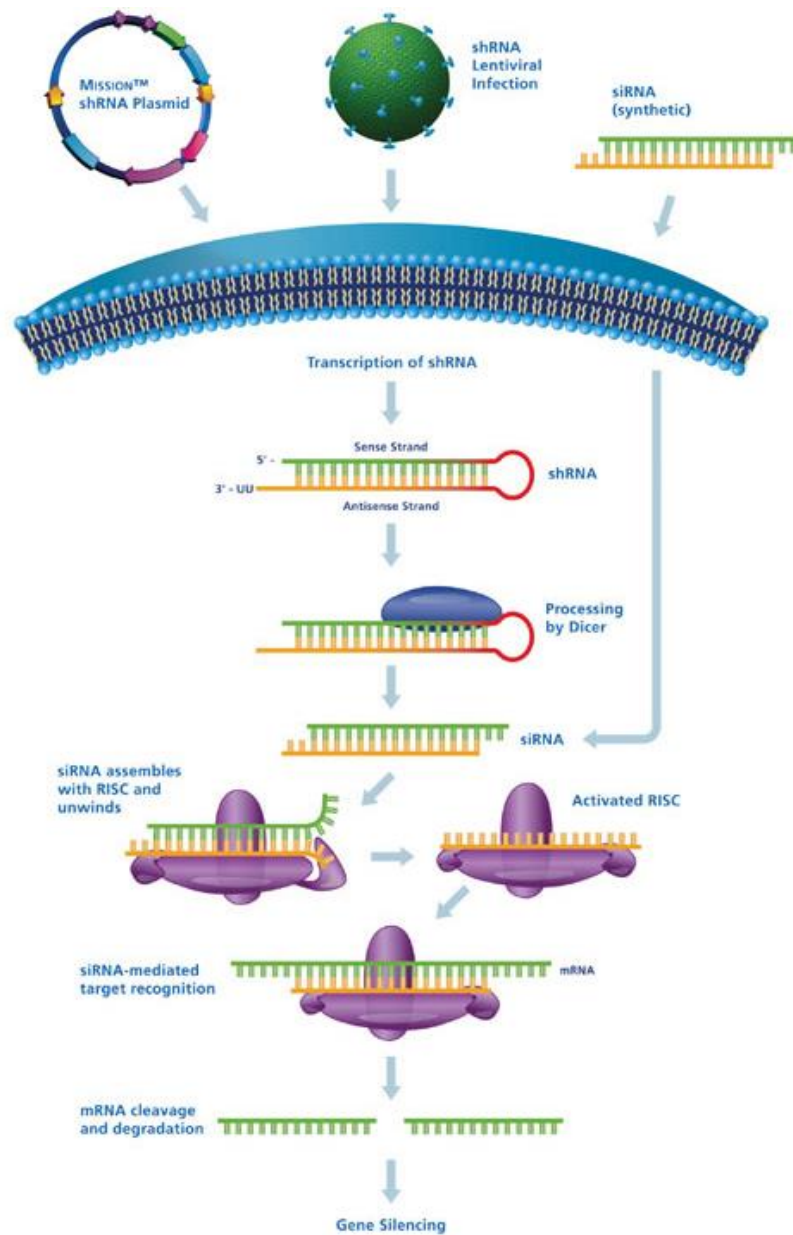


Figura 13. Silenciamento gênico mediado por *shRNA* e *siRNA*. A molécula interferente pode ser inserida na célula tanto na forma de *siRNA* sintético (duplex), quanto na forma de *shRNA*. O *shRNA* é processado pela Dicer,

e o duplex de siRNA gerado associa-se à proteína Argonauta dentro do precursor do complexo de silenciamento induzido por RNAi (pre-RISC). Uma fita do duplex é removida e o complexo RISC maduro, contendo a fita guia, direciona o complexo para o RNAm alvo, associando-se a ele para o silenciamento pós-traducional, clivando o RNAm (Adaptado de Davidson et al., 2011 e GEN, 2006).

4.9. Citospin e coloração de Leishman

A morfologia das células foi analisada através de lâminas de citospin coradas com Leishman. Um total de 2×10^4 células ressuspendidas em 100 μ L foi utilizada para cada lâmina de citospin, e a centrifugação foi realizada a 3000 rpm por 3 min em citocentrífuga (CT-2000; Cientec, Belo Horizonte, BRA). As lâminas foram secadas ao ar e então coradas com corante de Leishman para posterior captura de imagens com o microscópio Olympus IX81 (Olympus Optical, Tóquio, JPN).

4.10. Citometria de fluxo

A diferenciação eritroide foi acompanhada utilizando os anticorpos de superfície celular anti-receptor de transferrina (CD71; Invitrogen): marcador de células eritroides jovens e anti-glicoforina A (CD235a; Invitrogen): marcador de células eritroides maduras. Para a detecção citoplasmática de HbF durante o processo de diferenciação eritroide, foi utilizado o anticorpo anti-HbF (Invitrogen) e o kit de permeabilização das membranas citoplasmáticas e fixação das células *Fix & Perm Cell Permeabilization Kit* (Invitrogen). As células marcadas foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson, EUA).

4.11. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

A CLAE-EM fez-se necessária para identificação das cadeias globínicas humanas e murinas em amostras de camundongos transgênicos. Cada amostra de sangue foi coletada em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Após centrifugação, os pellets de hemácias foram coletados e lavados três vezes com solução de NaCl 0.9% (w/v) antes da lise por vórtex em 30 μ L de água deionizada e 12 μ L de CCl_4 puro. A fase aquosa contendo as hemoglobinas foi coletada por centrifugação (20,000 x g, 10 min, 4°C), filtrada e analisada por CLAE-EM.

As análises de CLAE foram feitas no *Acquity Classic UPLC System* (Waters, Milford, MA, EUA). Amostras de camundongo, humano e padrões comerciais de globinas humanas (10 µl) foram inicialmente corridas em 95% do solvente A (0.05% ácido trifluoroacético – TFA – em água deionizada), 5% do solvente B (0.05% TFA em 7:3 acetonitrila: isopropanol) na coluna *Sigma-Aldrich Supelco BIOshell C4 3.4u 2.1mm x 150mm 400A RP-HPLC* (Sigma-Aldrich). As cadeias globínicas foram resolvidas em gradiente programado (500 µl/min) com os solventes A e B (95% solvente A, 5% solvente B por 0-4 min; 65% solvente A, 35% solvente B por 4-19 min; 50% solvente A, 50% solvente B por 19-19.5 min; 100% solvente B por 19.5-22 min e; 95% solvente A, 5% solvente B por 22-25 min). O efluente da coluna foi dividido de forma desigual (pós-coluna) entre o espectrômetro de massas híbrido de tempo de voo (150 µl/min), equipado com *eletrospray*; e o descarte de solvente (350 µl/min). Os espectros de fragmentos iônicos positivos (scans de 1 s) foram adquiridos entre as massas de 250 a 2500 m/z, e simultaneamente foram coletados os dados de correção de *lock-mass* (para correção pós-aquisição) usando o *sprayer* auxiliar *Synapt HDMS* para introduzir (scans de 1 s) o peptídeo encefalina leucina (YGGFL) a cada 30 s. O espectro de cluster de íons NaI foram coletados sob as mesmas condições e usados para executar o tempo de calibração de massas.

As funções e aquisição de dados do equipamento foram controladas utilizando o software *Waters Mass Lynx 4.1* (SCN 872). A identificação das espécies de hemoglobina residentes em cada pico foi determinada usando o algoritmo *Mass Lynx MaxEnt 1* para a deconvolução dos espectros multi-carregados ESI associados com cada pico do espectro e para determinar o espectro de carga zero para a molécula que gerou o pico cromatográfico. A quantificação de cada espécie de hemoglobina foi realizada por integração manual da área sob a corrente iônica total dos picos cromatográficos usando o software *Mass Lynx*.

4.12. Extração de RNA total

As amostras de RNA foram extraídas com o kit comercial *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2%, sendo as amostras armazenadas em freezer -80°C.

4.13. Síntese de cDNA

A fita-molde de cDNA foi obtida através de reação de transcrição reversa, com o RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, EUA). Os cDNAs obtidos foram utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real.

4.14. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As reações de PCR foram preparadas com o reagente SYBR® Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems – Life Technologies Corp., EUA) e a detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento Step One Plus® (Applied Biosystems). As amostras foram amplificadas em duplicata, com o uso de controles negativos para cada primer com poços contendo água estéril em substituição à amostra. O método de $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ foi empregado para calcular a expressão relativa dos genes alvos, que foi normalizada pela expressão dos genes endógenos *RPL13* (*Ribosomal protein L13*) e *RPLP0* (*Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) para as diferentes amostras.

4.15. Ensaio de proteção de ribonuclease (EPR)

Amostras de RNA total isoladas de sangue de camundongos transgênicos β -YAC foram utilizadas para detecção do RNAm de globinas humanas e murinas por ensaio de proteção de RNase descrito por Peterson et al., 2012. Sondas de RNA antissenso foram preparadas com o *MaxiScript II kit* (Ambion, Austin, EUA). Os DNAs usados para preparar as *riboprobes* para quantificar as globinas murinas α e γ , e globinas- β foram pT7Mo α , pT7A γ m(170), e pT7 β m (Li & Stamatoyannopoulos, 1994; Li et al., 1997; Stamatoyannopoulos et al., 1993). Os níveis expressão de cada globina humana β -like foram quantificados como porcentagens da expressão total das globinas humanas β -like, corrigidos pelo número de cópias do transgene e dos genes de globinas endógenas murinas $\{[(Hu \gamma/\beta\text{-YAC número de cópias})/(Mo \alpha/4)] \times 100\}$. Os dados foram coletados com o *Cyclone phosphorimager* e o software de análise *OptiQuant* (Packard Instruments, Meriden, EUA) e apresentados em média e desvio padrão para três experimentos independentes, cada um incluindo o RNA total isolado de sangue de dois camundongos transgênicos adultos de cada linhagem transgênica.

4.16. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o software Prism versão 5 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Quando comparados dois grupos (controle e portadores de PHHF não delecional tipo Brasileira), foi utilizado teste *t* de *Student* para dados não pareados. Quando necessário foi utilizada análise de variância, seguida de teste para comparação múltipla de médias. Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos camundongos transgênicos β -YAC

Foram utilizadas três linhagens -175 PHHF e duas -195 PHHF de camundongos transgênicos β -YAC, bem como uma linhagem -117 PHHF e uma linhagem *wild type* β -YAC utilizadas como controles dos experimentos. As análises de CLAE-EM mostraram que os camundongos da linhagem -175 PHHF apresentaram maiores níveis de cadeias de globina- γ [média = 25.8% $\gamma/(\gamma+\beta)$], seguido pelos animais da linhagem -195 PHHF (média = 18.4%; tabela II). Os camundongos controle *wild type* β -YAC não expressam globina- γ , e os camundongos controle para PHHF, com a mutação -117 G \rightarrow A, apresentaram, em média, 13.8% de cadeias globínicas- γ . A avaliação da expressão do RNAm de globina- γ^A pelo ensaio de proteção de ribonuclease (EPR; figura 14), corrobora com os dados de CLAE-EM; sendo $\gamma/(\gamma+\beta)$ de 34%, 12%, 14.1% e 0% para os animais PHHF -175, PHHF -195, PHHF -117 e *wild type* β -YAC, respectivamente (Tabela IV). Os valores relativos dos níveis de mRNA determinados por qPCR também se mostraram consistentes com os resultados de EPR (Tabela II).

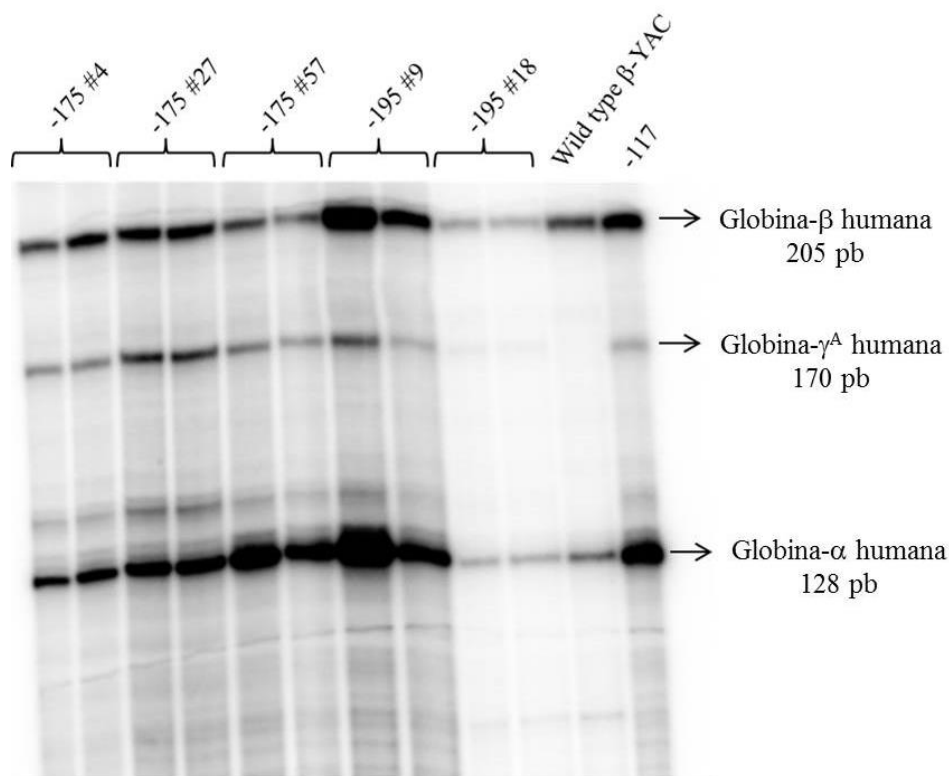


Figura 14. Resultados de EPR das globinas humanas β e γ^A , e da globina murina α . A expressão desses genes das globinas foram analisados nas linhagens de camundongos transgênicos para PHHF -175 #4, -175 #27,

-175 #57, -195 #9 e -195 #18, comparados com as linhagens *wild type* β -YAC (controle negativo) e PHHF -117 (controle positivo).

Tabela IV. Média \pm desvio padrão das cadeias globínicas- γ (CLAE-EM) e níveis de RNAm (EPR e qPCR), em diferentes linhagens de camundongos transgênicos β -YAC, normalizados pelo total de cadeias globínicas- β ou seus níveis de RNAm, respectivamente; $[\gamma/(\beta+\gamma)] \times 100$. Os valores de qPCR foram normalizados de acordo com os valores de expressão do RNAm da globina- α murina.

Linhagem de camundongo	Número de cópias do transgene	% $\gamma/(\beta+\gamma)$ ¹		EPR	qPCR
		CLAE-EM	EPR	Expressão de globina- γ por cópia ²	γ/α ³
-175 #4	2	26,39 \pm 2,68	25,33 \pm 2,52	13,23 \pm 5,88	448 \pm 234
-175 #27	2	20,75 \pm 0,88	34,67 \pm 4,04	27,80 \pm 7,33	1323 \pm 147
-175 #57	1	29,88 \pm 2,22	42,00 \pm 5,20	22,01 \pm 7,59	234 \pm 20
-195 #9	3	15,91 \pm 2,08	10,67 \pm 1,82	10,19 \pm 4,83	245 \pm 89
-195 #18	4	14,67 \pm 0,22	13,38 \pm 3,49	20,87 \pm 10,07	223 \pm 32
-117 (controle positivo)	2	13,75 \pm 0,85	14,05 \pm 1,05	11,01 \pm 3,08	420 \pm 76
<i>Wild type</i> β -YAC (controle negativo)	3	0	0	0	1 \pm 0,11

CLAE-EM = Cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas; EPR = Ensaio de proteção de ribonuclease; qPCR = PCR quantitativo em tempo real.

¹Média \pm desvio padrão

² $[(\text{Hu } \gamma/\text{número de cópias } \beta\text{-YAC})/(\text{Mo } \alpha/4)] \times 100$; média \pm desvio padrão

³Aumento em “fold” relativo ao *wild-type* β -YAC

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para determinar a distribuição de HbF nos eritrócitos adultos dos camundongos β -YAC transgênicos (Figura 15). Os camundongos das linhagens de PHHF -175 #27, -175 #57 e -195 #9, exibiram distribuição heterocelular de HbF, enquanto que a linhagem controle de PHHF -117 mostrou distribuição pancelular de HbF, como já anteriormente documentado (Costa et al., 2012a). Esses dados mostraram-se consistentes com os fenótipos observados em humanos, exceto pela distribuição de HbF nas linhagens de PHHF -175, que é pancelular em humanos (Forget, 1998). Os níveis de HbF também foram concordantes com os encontrados em humanos, variando de 36-41%, 4,5-16%, 12-16% e menos de 1% nas PHHF -175 T \rightarrow C, -195 C \rightarrow G e -117 G \rightarrow A, e indivíduos controle, respectivamente (Forget, 1998; Roversi, 2011).

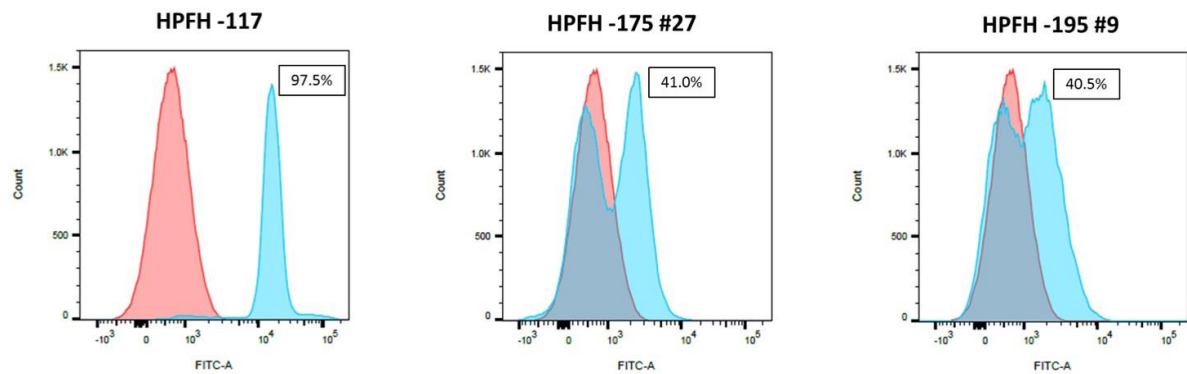


Figura 15. Análise de citometria de fluxo de células isoladas de amostras de sangue periférico de camundongos transgênicos adultos, utilizando anticorpo anti-HbF conjugado à FITC. Cada painel mostra a comparação entre as linhagens de PHHF (em azul) e as amostras de camundongos não transgênicos (em vermelho). A porcentagem mostrada em cada gráfico indica a população de células que expressaram HbF, após subtração dos valores da amostra não transgênica (que não expressa HbF).

Os camundongos transgênicos β -YAC refletem temporalmente e espacialmente os dois *switchings* de hemoglobina que ocorrem em humanos (basicamente, síntese de globina- ϵ no saco vitelínico para genes da globina- γ no fígado fetal, e então da expressão de globina- γ para expressão de globina- β na medula óssea) durante os aproximadamente 21 dias de período de gestação. Além disso, os modelos de camundongos β -YAC de PHHF mostraram níveis elevados de globina- γ (tanto transcritos como cadeias) e o padrão de distribuição de HbF reflete o encontrado na população humana. Essas características fazem dos modelos de camundongos transgênicos β -YAC, ferramentas poderosas para explorar os mecanismos regulatórios que governam a expressão de globina- γ .

5.2. Análise de ligação de fatores de transcrição no promotor do gene *HBG1* em células dependentes de CID

As células dependentes de CID, células imortalizadas derivadas da medula óssea dos camundongos transgênicos β -YAC, são bons modelos de estudo da regulação da expressão de globina- γ , uma vez que essas células mimetizam o padrão de síntese globínica humano (Blau & Peterson, 2006). Assim, também realizamos experimentos de ChIP com essa linhagem celular, derivada de células isoladas da medula óssea de camundongos transgênicos β -YAC *wild type*, e portadores da mutação de PHHF -195 C \rightarrow G. Nesse ensaio, o

recrutamento dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 foi avaliado. Apesar dos resultados mostrarem uma tendência do maior recrutamento de YY1 no promotor da sequência não mutada e do maior recrutamento de PAX1 na região promotora com a sequência mutada (-195 C→G), essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 16).

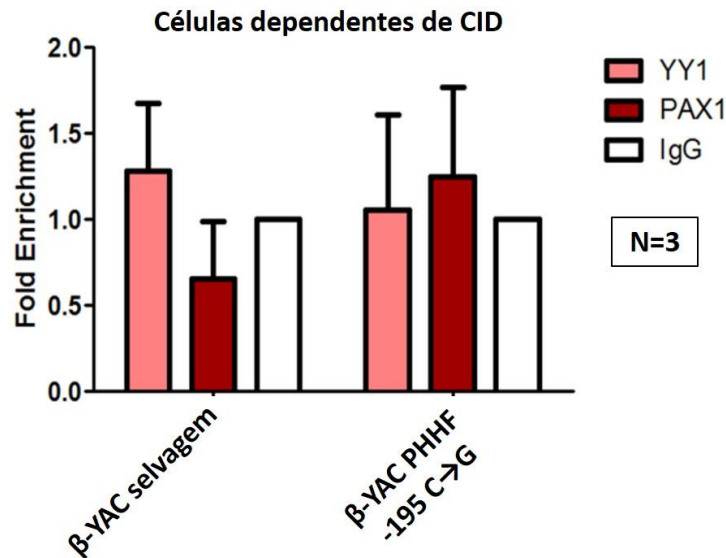


Figura 16. Análise de ChIP de células dependentes de CID derivadas da medula óssea de camundongos transgênicos β-YAC. Para esse ensaio, de células dependentes de CID derivadas da medula óssea de camundongos transgênicos β-YAC *wild-type* e com portadores da mutação de PHHF -195 C→G, utilizando anticorpos contra os fatores de transcrição YY1 e PAX1 (N=3).

Esses resultados poderiam ser explicados pela diferença na sequência de aminoácidos entre as isoformas das proteínas PAX1 de humano e de camundongo, mas não com relação à proteína YY1, cujas sequências são bastante similares entre murinos e humanos. Ademais, as células dependentes de CID são isoladas de animais adultos, que no caso dos camundongos β-YAC *wild type*, somente expressam globina-β. Portanto, talvez o tratamento das células dependentes de CID com algum agente indutor de HbF como butirato ou hemina, e posterior análise por ChIP, poderiam trazer maiores informações a respeito do envolvimento desses fatores de transcrição na regulação da expressão de globina-γ.

5.3. Análise de ligação de fatores de transcrição no promotor do gene *HBG1* em células de fígado fetal de camundongos transgênicos β -YAC

A mutação de ponto C>G identificada na posição -195 do gene *HBG1* foi descrita por Costa et al. (1990) e está associada a uma moderada elevação dos níveis de HbF em indivíduos heterozigotos, variando de 6,0 a 16,0%. Os mecanismos moleculares que regulam a expressão do gene *HBG1* devido à mutação -195 C→G na sua região promotora, ainda permanecem obscuros. Em três linhagens celulares (K562, HEL e HEK293), a mutação -195 C→G aumenta a expressão do gene da luciferase ligado ao promotor de globina- γ na presença do fragmento 5' *hypersensitive site 2* (5'HS2) do *LCR* (Schreiber et al., 2001; Takahashi et al., 2003). Apesar da reativação do gene *HBG1* na PHHF não deletional tipo Britânica (mutação -198 T>C) ser mediada pelo fator de transcrição SP1, o mesmo não se aplica para a mutação -195 C→G (Takahashi et al., 2003). Dados do nosso grupo de pesquisa ainda não publicados de bioinformática, SAGE e *array* DNA-proteína em células humanas primárias progenitoras eritroides isoladas de indivíduos controle e com a mutação -195 C→G, indicam fortemente o envolvimento dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 na regulação da expressão do gene *HBG1*. Com base nesses dados, a reativação do gene da globina- γ na PHHF não deletional tipo Brasileira parece ser devida à diminuição da ligação de YY1, uma vez que a mutação -195 C→G modifica o sítio de ligação à YY1, criando um novo sítio de ligação à PAX1, aumentando seu recrutamento na região promotora mutada do gene *HBG1*. Apesar de PAX1 nunca ter sido associado à regulação de quaisquer genes das globinas, já foi mostrado que YY1 está envolvido na regulação da expressão de globina- γ . Um sítio de ligação à YY1 próximo à posição -269 do promotor do gene *HBE*, sobrepõe-se a dois sítios de ligação à GATA-1 (Li & Stamatoyannopoulos, 1994). Mutações nesse sítio de ligação à YY1 levam à continuada expressão de globina- ϵ na vida adulta, indicando que YY1 pode agir como repressor do gene *HBE* (Raich et al., 1995).

Não foram encontradas diferenças significativas na ocupação dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 na região promotora do gene *HBG1* (Figura 24) em células de fígado fetal E18 (embriões com 18 dias pós-concepção). Inicialmente, pensamos que as diferenças observadas entre os resultados encontrados entre células humanas progenitoras eritroides e de camundongos transgênicos fosse devido à natureza inerente dos dois sistemas experimentais. Nos fígados fetais de embriões do dia 18 pós-concepção (E18) de camundongos *wild type*, o *switching* de globina- γ para globina- β (HbF para HbA) já ocorreu

e, portanto, os genes da globina- γ já estão silenciados nesse estágio. Já nas culturas de células humanas primárias progenitoras eritroides, no dia 13 de cultura, momento no qual os experimentos de ChIP foram realizados, a expressão de globina- γ está relativamente alta, devido à adição de eritropoetina no meio de cultura. Portanto, a realização do ensaio de ChIP com células isoladas de fígado fetal do dia E12 parecia ser o mais apropriado, uma vez que o *switching* de globina- γ para globina- β ainda não ocorreu e o gene da globina- γ ainda está expresso. Contudo, também não encontramos diferenças estatisticamente significativas na ocupação de YY1 ou PAX1 entre às sequências promotoras controle e mutadas (-195 C→G) do gene *HBG1* de amostras de fígado fetal do dia E12 de camundongos transgênicos β -YAC (Figura 17).

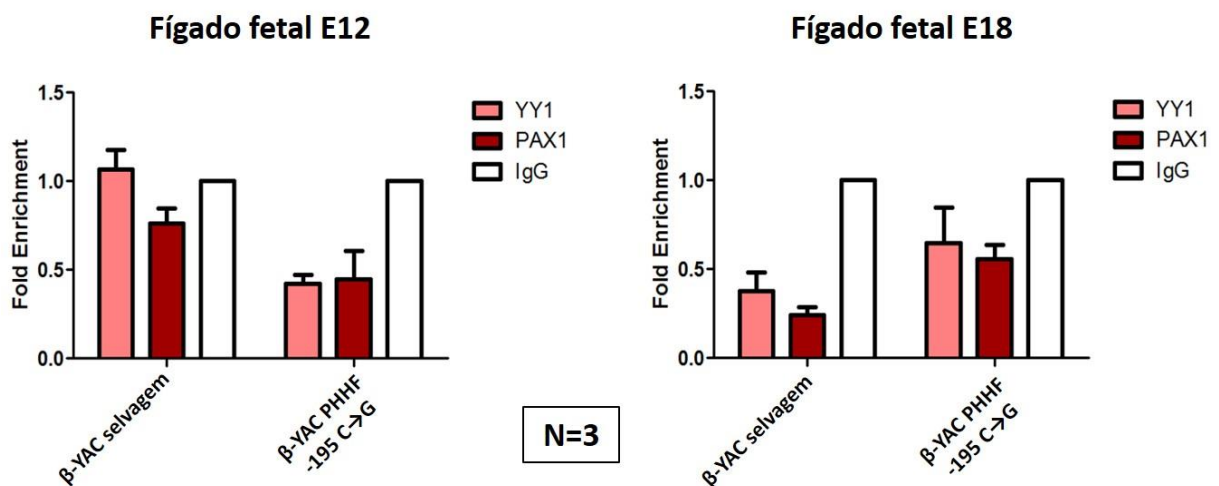


Figura 17. Ensaio de ChIP com amostras de fígado fetal dos dias E12 e E18 de camundongos transgênicos β -YAC. Para esse ensaio, camundongos transgênicos β -YAC *wild-type* e com a mutação de PHHF -195 C→G, utilizando anticorpos anti-YY1 e anti-PAX1 (N=3).

Os ensaios de ChIP com amostras de fígado fetal do dia E18 utilizando anticorpos contra os fatores de transcrição já associados à regulação dos genes das globinas: Mi2 (Harju-Baker et al., 2008; Costa et al., 2012b), GATA-1 (Raich et al., 1995; Li et al., 1997; Wadman et al., 1997; Vakoc et al., 2005; Harju-Baker et al., 2008; Yu et al., 2009; Yun et al., 2014), LMO2, TAL1, LDB1 (Wadman et al., 1997; Lécuyer et al., 2007, Yu et al., 2009, Yun et al., 2014), LRF (Lee et al., 2013), FOG-1 (Harju-Baker et al., 2008; Vakoc et al., 2005), MTA1 (Xue et al., 1998; Kransdorf et al., 2006), YY1 (Raich et al., 1995 e dados não publicados) e PAX1 (dados não publicados); não mostraram nenhuma diferença estatisticamente

significativa no recrutamento dessas proteínas na região promotora do gene *HBG1* na presença das mutações de PHHF -117 G→A, -175 T→C e -195 C→G (Figura 18).

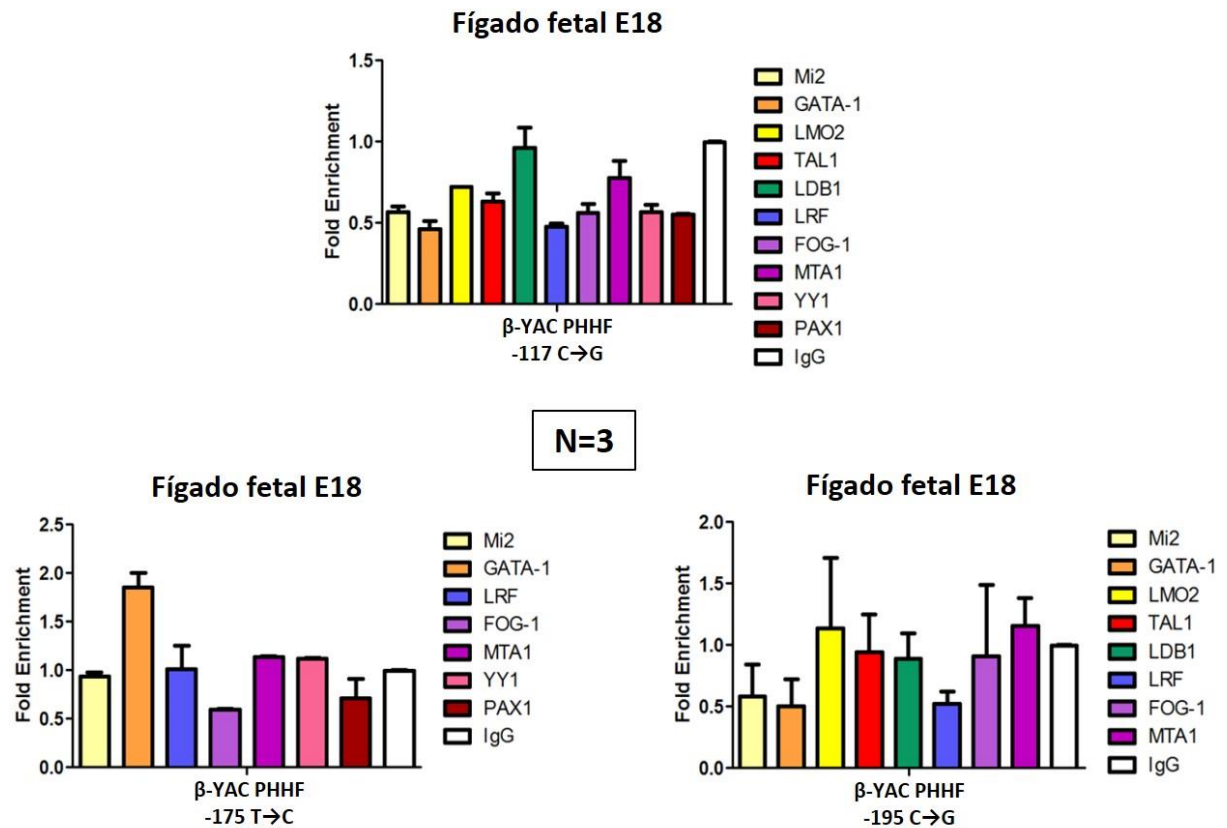


Figura 18. Ensaio de ChIP com amostras de fígado fetal do dia E18 de camundongos transgênicos β-YAC. Para esse ensaio, camundongos transgênicos β-YAC *wild-type* e com as mutações de PHHF -117 G→A, -175 T→C e -195 C→G, utilizando anticorpos contra os fatores de transcrição YY1, PAX1, Mi2, GATA-1, LMO2, TAL1, LDB1, LRF, FOG-1 e MTA1 (N=3).

As análises de ChIP com amostras de fígado fetal do dia E18 de camundongos *wild-type* β-YAC e PHHF -175 C>T mostraram diferença significativa na ocupação dos fatores de transcrição TAL1, LMO2 e LDB1, na presença da mutação na região promotora do gene *HBG1* (Figura 26). Diversos estudos têm mostrado que a regulação dos genes das globinas β-like são mediados em parte pelo complexo de proteínas LDB1/LMO2/GATA-1/TAL1, o qual promove a interação entre as regiões promotoras dos genes e do LCR, via dobramento da cromatina (Wadman et al., 1997; Vakoc et al., 2005; Song et al., 2007; Kiefer et al., 2011; Song et al., 2012; Yun et al., 2014). TAL1 é um fator de transcrição do tipo hélice-volta-hélice importante para o desenvolvimento de todas as linhagens hematopoiéticas

(Anantharaman et al., 2011), e se liga a diferentes regiões regulatórias dos genes das globinas no cluster humano de globina- β (Song et al., 2007; Kiefer et al., 2011; Yun et al., 2004; Wienert et al., 2015). O LDB1 atua como um fator “ponte”, trazendo complexos proteicos ligados a regiões distantes do DNA para que se aproximem e sejam capazes de interagir uns com os outros por meio da formação de dobramentos na de DNA (Deng et al., 2012). O LDB1 possui um domínio LIM na porção C-terminal, permitindo sua ligação com outros membros do complexo de proteína via ligação à LMO2 (Song et al., 2007). LMO2 predominantemente interage com TAL1 em células hematopoiéticas. A interação entre TAL1 e LMO2 estabiliza o complexo LDB1 e modula a atividade do complexo de proteínas (Lécuyer et al., 2007). Vários estudos indicam que GATA-1 liga-se à região -175 do gene *HBG1* (Martin et al., 1989; Liu et al., 2005) e interage com TAL1 para ativar a expressão gênica eritroide (Tripic et al., 2009; Yu et al., 2009). Adicionalmente, Song et al. (2007) demonstraram que a ligação de TAL1 é dependente da ligação de GATA-1 no promotor gênico. Contudo, nossos resultados mostraram que GATA-1 não faz parte do complexo de ativação do gene *HBG1* na presença da mutação -175 C>T. Wienert e colaboradores encontraram resultados similares, demonstrando que na presença da mutação -175 C>T em células MEL de camundongos e em células humanas da linhagem K562, a expressão de hemoglobina fetal foi aumentada por um recrutamento *de novo* de TAL1, o qual interage com LDB1 e LMO2 para promover o dobramento de cromatina do distante LCR à região promotora de globina- γ^A . Os dados desse trabalho mostraram que o recrutamento de GATA-1 foi aumentado somente em 1,7 vezes na presença da mutação -175 C>T comparado com a condição controle, indicando que GATA-1, provavelmente, não tem papel importante na reativação do gene *HBG1* na presença da mutação de PHHF.

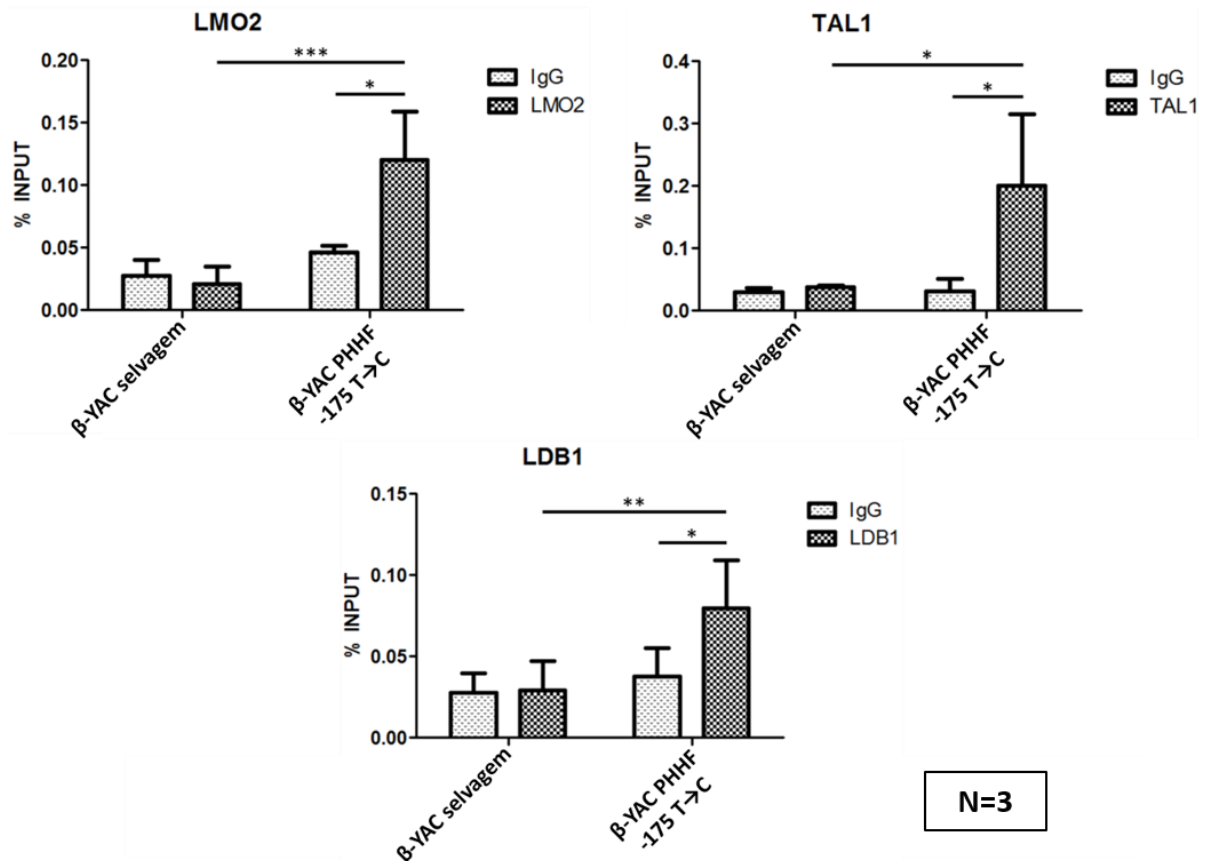


Figura 19. Ensaio de ChIP com amostras de fígado fetal do dia E18 de camundongos transgênicos β-YAC selvagem e com a mutação de PHHF -175 T→C, utilizando anticorpos anti-TAL1, anti-LMO2 e anti-LDB1. Foi observado significativo aumento da ocupação desses três fatores de transcrição ($P < 0.05$) na região promotora do gene *HBG1* na presença da mutação -175 C>T. Dados apresentados em média \pm desvio padrão. * = P-valor < 0.05 ; ** = P-valor < 0.01 ; *** = P-valor < 0.001 ; N=3.

5.4. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) em cultura primária de células eritroides

Células progenitoras hematopoéticas CD34⁺ foram isoladas de indivíduos com PHHF não delecional tipo Brasileira e indivíduos controle com idade, sexo e etnia pareados e mantidas em cultura eritroide por 13 dias (Figura 20). As células foram coletas no 13º dia da cultura eritroide para o ensaio de imunoprecipitação de cromatina.

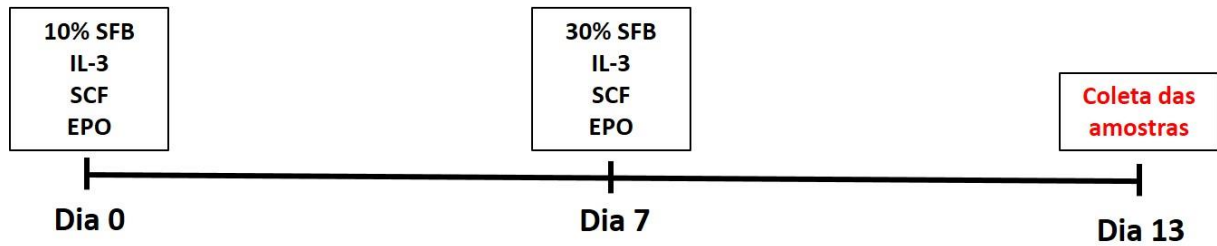


Figura 20. Esquema da cultura primária eritroide. Nesse método de cultura, composto por duas fases, a indução eritroide (adição de EPO) ocorre desde o dia 0 de cultura. Para os ensaios de ChIP, as células eritroide foram coletadas no dia 13 de cultura.

No gráfico da figura 21, é possível verificar que o fator de transcrição YY1 foi mais recrutado no promotor do gene *HBG1* no indivíduo controle do que no indivíduo com PHHF (P-valor $\leq 0,05$). E o contrário aconteceu com o fator de transcrição PAX1, que foi mais recrutado no promotor do gene *HBG1* no indivíduo com PHHF não deletional tipo Brasileira do que no indivíduo controle (P-valor $\leq 0,05$). Portanto, esses dados sugerem que a mutação -195 C→G realmente interfere na afinidade de ligação desses dois fatores de transcrição à região promotora do gene *HBG1*, indicando a possível relação dessas proteínas na regulação da expressão de globina- γ^A .

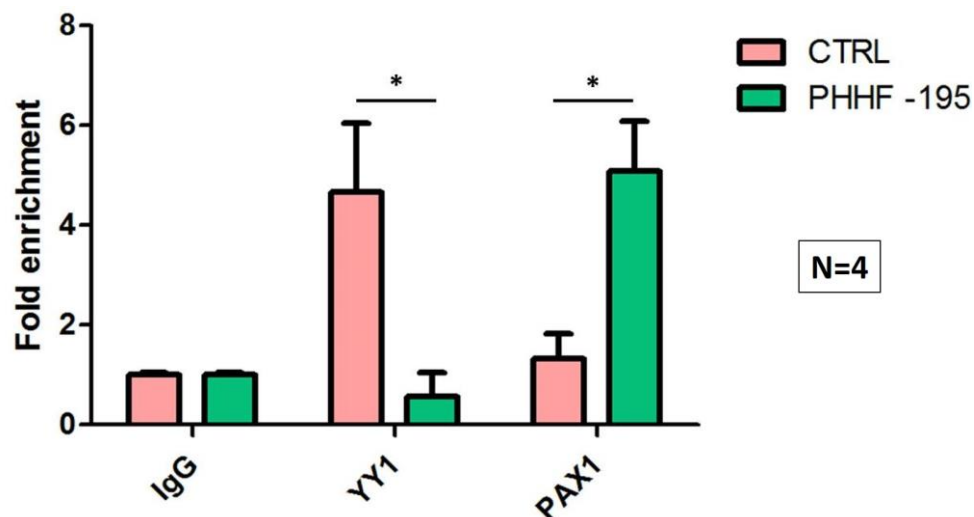


Figura 21. Recrutamento dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 no dia 13 da cultura eritroide controle e proveniente de portadores de ndPHHF tipo Brasileira. O ensaio de ChIP (N=4) mostra a diferença de recrutamento dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 (em *fold enrichment*) pelo promotor do gene *HBG1* em indivíduo controle (CTRL) e com ndPHHF tipo Brasileira (PHHF -195). Como normalizador foi utilizado o controle isogênico IgG (mock). * = P-valor $\leq 0,05$.

5.5. Silenciamento gênico com partículas lentivirais em células K562 e KU812

As partículas lentivirais *MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles* (Sigma Aldrich, EUA) e do kit *shRNA (h) Lentiviral Particles* (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) foram utilizadas para fazer o *knockdown* do gene alvo *YY1*. Após a transdução e seleção por puromicina, as células mostraram-se viáveis e em proliferação. Na figura 22 estão apresentados o esquema do método de cultura, silenciamento gênico e seleção das células transduzidas.

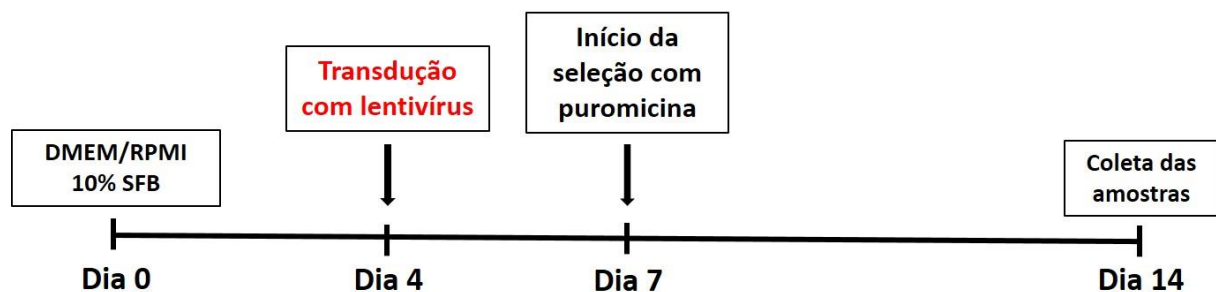


Figura 22. Esquema da cultura das linhagens eritroides K562 e KU812 e silenciamento gênico. As células K562 e KU812 foram cultivadas por 14 dias, sendo a transdução realizada no dia 4 de cultura. A seleção com puromicina foi iniciada 72h após a transdução e se manteve por 7 dias, até a coleta das amostras de células.

Na figura 23 estão as porcentagens da expressão gênica de *YY1* e *HBG1* com relação à condição controle em células K562 transduzidas com partículas virais contendo o *shRNA* para alvo *YY1*. Como mostrado na figura 23, obtivemos nível considerável de silenciamento do gene alvo *YY1* com relação às células controle ($P=0,0044$; $N=5$). Contudo não observamos o aumento da expressão do gene *HBG1*, como postulado por nossa hipótese inicial, mas sim o contrário, uma redução da expressão de globina- γ , com relação à condição controle.

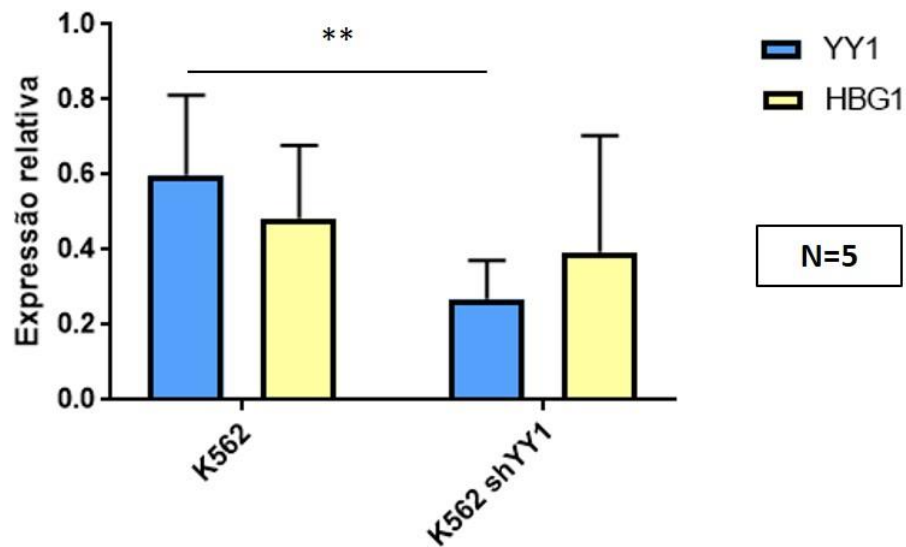


Figura 23. Expressão gênica relativa dos genes *YY1* e *HBG1* em cultura de células K562 no ensaio de silenciamento do gene *YY1*. A diminuição da expressão do gene *YY1* entre células controle (K562; células não transduzidas ou transduzidas com o vetor vazio ou com sequência *scrambled*) e transduzidas com as partículas lentivirais contendo *shRNAs* com alvo para o gene *YY1* mostrou-se significativa (K562 shYY1; $P=0,0044$; $N=5$). O mesmo não ocorreu com o gene *HBG1*, que apresentou moderada diminuição de sua expressão frente ao silenciamento do gene *YY1*.

O silenciamento do gene *YY1* também foi realizado em células KU812. Na figura 24, estão apresentadas as porcentagens da expressão dos genes *HBG1* e *YY1* nas células KU812 transduzidas com as partículas virais para silenciamento do gene *YY1*. Nesse gráfico é possível notar que a transdução com as partículas virais foi capaz de diminuir a expressão do gene alvo com relação à condição controle. O *knockdown* do gene *YY1* também foi satisfatório nessa linhagem celular ($P=0,0006$; $N=6$) e, novamente, observamos diminuição na expressão do gene *HBG1*.

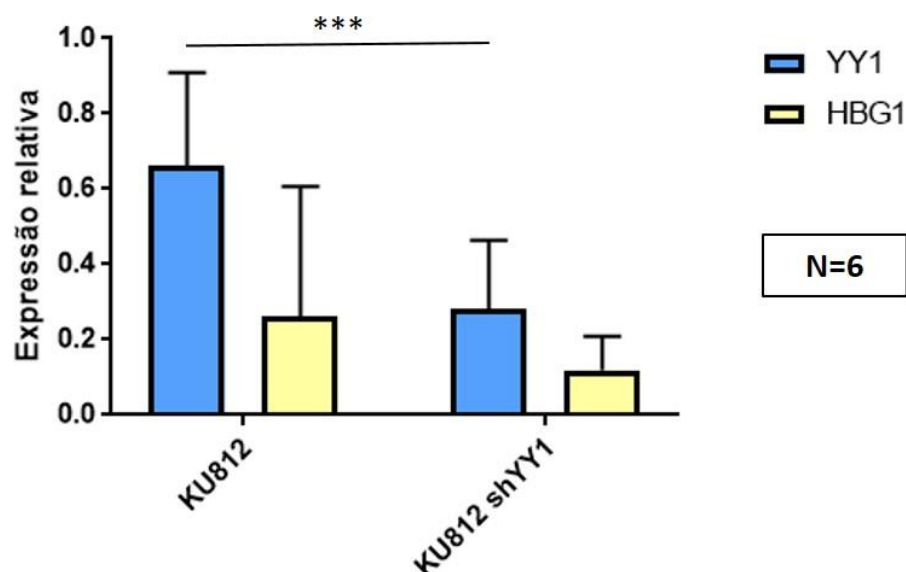


Figura 24. Expressão gênica relativa dos genes *YY1* e *HBG1* em cultura de células KU812 no ensaio de silenciamento do gene *YY1*. A diminuição da expressão do gene *YY1* entre células controle (KU812; células não transduzidas ou transduzidas com o vetor vazio ou com sequência *scrambled*) e transduzidas com as partículas lentivirais contendo *shRNAs* com alvo para o gene *YY1* mostrou-se significativa (KU812 shYY1; $P=0,0006$; $N=6$). O mesmo não ocorreu com o gene *HBG1*, que apresentou moderada diminuição de sua expressão frente ao silenciamento do gene *YY1*.

5.6. Caracterização da nova cultura primária eritroide

Com o intuito de obter maior número de células na cultura eritroide humana, buscamos implantar um novo método de cultura eritroide. Nesse método, as células humanas $CD34^+$ isoladas de sangue periférico são mantidas em cultura por 14 dias em meio livre de soro, sendo dividida em duas fases: expansão e diferenciação (Mahajan et al., 2009; figura 25). Na fase I, as células são expandidas por sete dias em meio StemSpan™ SFEM (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, CAN) suplementado com StemSpan™ CC100 (Stemcell Technologies). Para induzir a diferenciação eritroide na fase II de cultura, as células são transferidas para meio StemSpan™ SFEM suplementado com 20ng/mL de SCF (R&D Systems), 5ng/mL de IL3 (R&D Systems), 2uM de dexametasona, 0.2uM de estradiol e 2U/mL de EPO (Eprex; Jansen – Cilag Farmacêutica Ltda). Durante toda a cultura, a concentração de células foi mantida por volta de 0.5×10^6 células/mL.

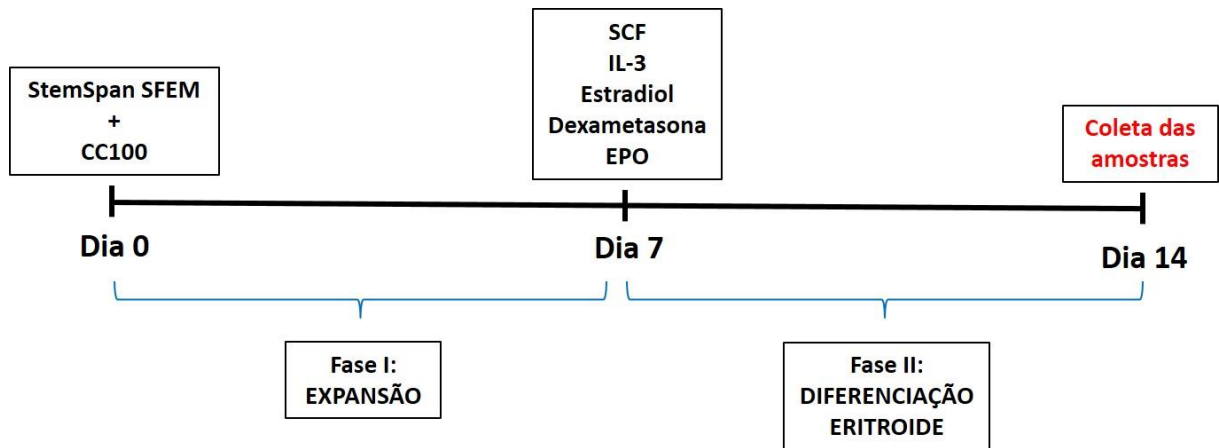


Figura 25. Esquema do novo método de cultura primária eritroide. Esse método de cultura é composto por duas fases: uma fase de expansão celular, sem adição de EPO, dos dias 0 ao 7, e uma fase de diferenciação eritroide, com adição de EPO, dos 7 a 14 de cultura.

A diferenciação eritroide *in vitro* foi monitorada por citometria de fluxo utilizando anticorpos contra os marcadores de superfície CD34, CD71 e CD235a. Durante os 14 dias de cultura, as células gradualmente perdem o marcador CD34, especialmente após a adição de EPO (eritropoetina, um indutor de diferenciação eritroide) no dia 7 de cultura, e passam a expressar os marcadores eritroides de superfície celular CD71 e CD235a (Figuras 26 e 27). Nos dias iniciais de cultura, quase 100% das células são positivas para o marcador CD34, e no último dia de cultura (dia 14) apenas ~ 20% das células expressavam o marcador de superfície CD34 (Figura 26), indicando que as células gradualmente perdem sua característica de progenitora para dar origem às células da linhagem eritroide. Na figura 28 está a caracterização das células durante a cultura eritroide. A população celular mostra-se mais heterogênea, quando comparada à população encontrada no método anterior de cultura, uma vez que a indução com o composto EPO ocorre por somente 7 dias. Contudo, ainda podemos observar eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos no dia 14 de cultura de células (Figura 28).

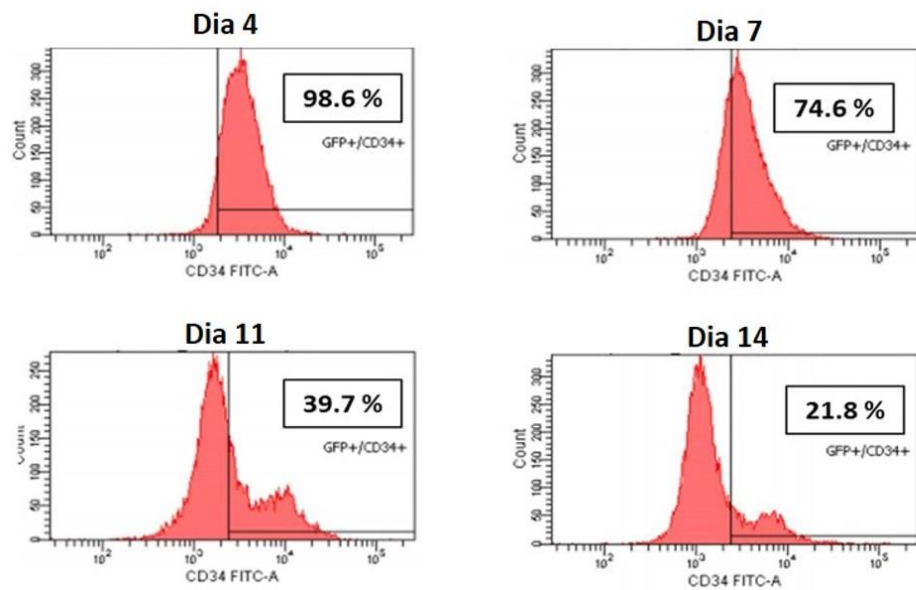


Figure 26. Análise do marcador de superfície CD34, por citometria de fluxo, de cultura de células primárias humanas hematopoéticas. Amostras de células foram coletadas e analisadas de dias 4, 7, 11 e 14 da cultura, marcadas com anticorpo anti-CD34 conjugado com FITC e avaliados por citometria de fluxo. É possível observar que as células perdem gradualmente esse marcador de superfície celular durante o período de cultura in vitro, havendo uma perda bastante acentuada, principalmente, após a adição de EPO à cultura no dia 7.

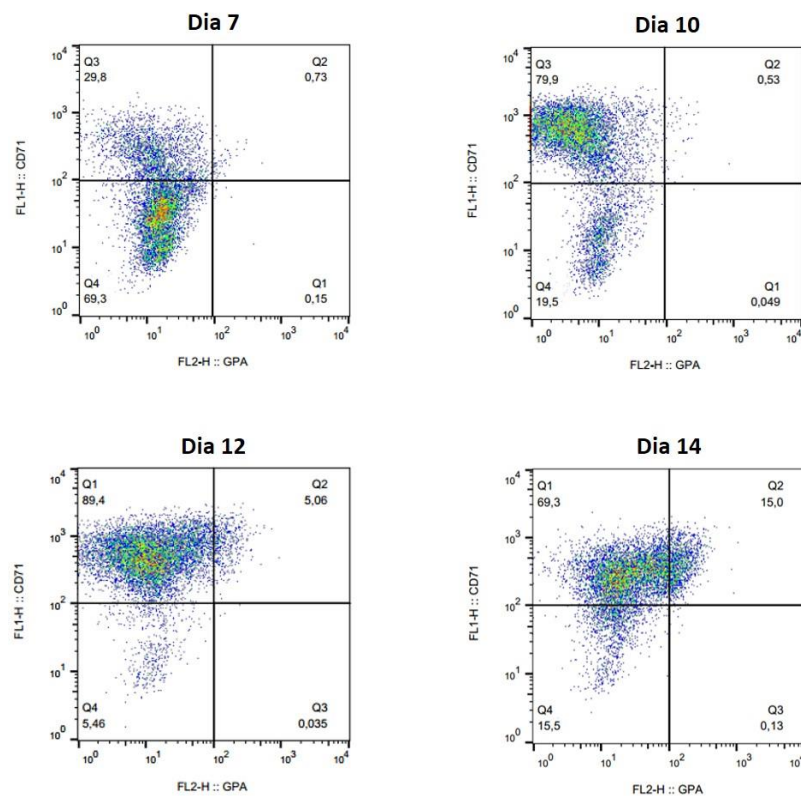


Figura 27. Dot plots da análise da diferenciação eritroide, por citometria de fluxo, de cultura de células primárias humanas hematopoéticas. As amostras foram coletadas nos dias 7, 10, 12 e 14 de cultura e foram

marcadas com anticorpos contra os marcadores de superfície CD71 (receptor de transferrina, marcador de células eritroides jovens) conjugado à FITC e CD235a (glicoforina A, marcador de células eritroides maduras) conjugado à R-PE.

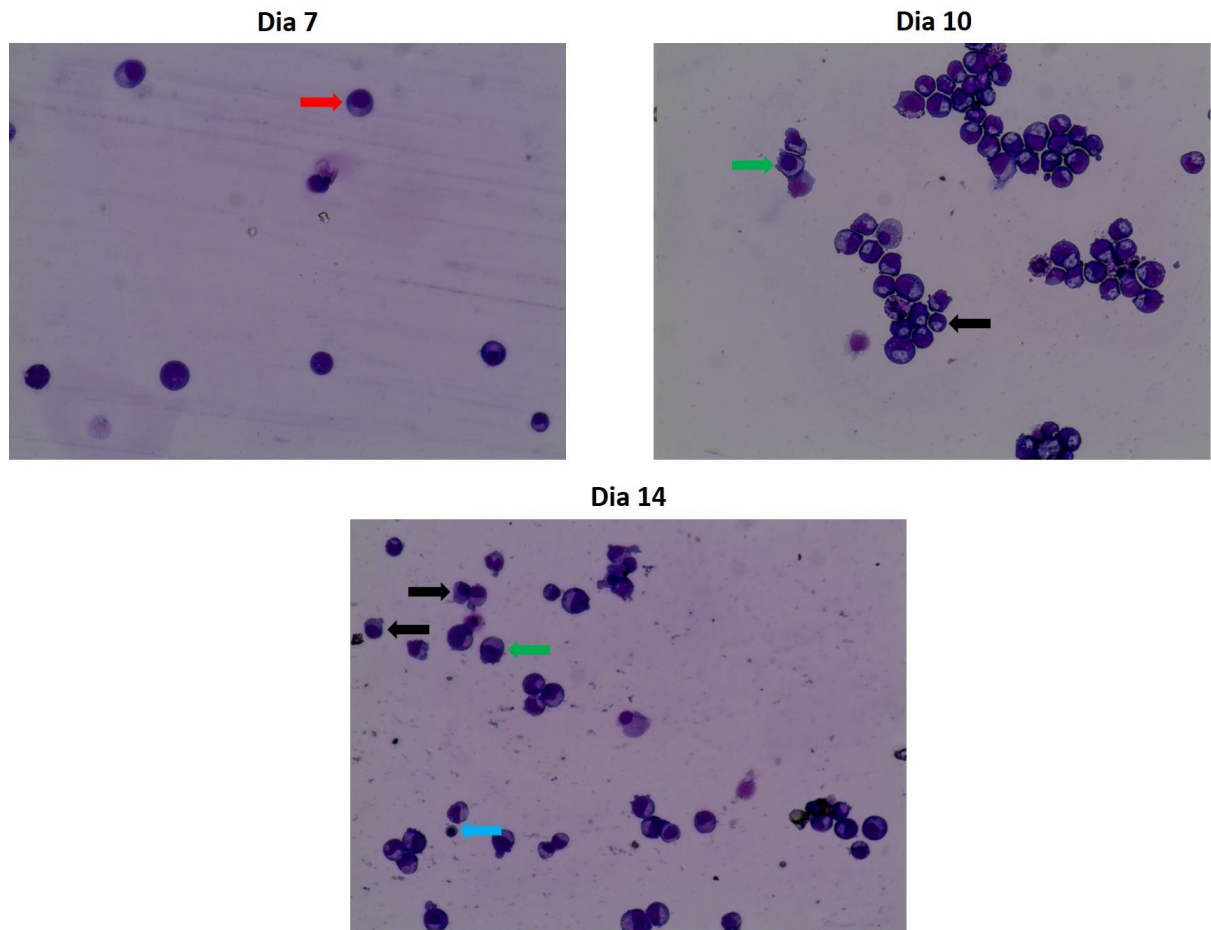


Figura 28. Avaliação da diferenciação eritroide por coloração de Leishman da cultura humana primária de células progenitoras eritroides. No dia 7 de cultura é possível encontrar somente proeritroblastos (seta vermelha). No dia 10 de cultura, são encontrados, em sua maioria, eritroblastos basófilos (setas verdes) e policromáticos (seta preta). No dia 14 de cultura, são observados eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos (seta azul).

5.7. Silenciamento gênico por *siRNA* em cultura primária de células eritroides humanas

Para testar a hipótese de que o fator de transcrição YY1 poderia atuar como repressor do gene *HBG1*, utilizamos o ensaio de RNA de interferência (RNAi). Três diferentes sequências de *siRNA* (YY1_A, YY1_B e YY1_C, da Origene) foram usadas para o

silenciamento do gene *YY1* e uma sequência *scrambled* (com sequência aleatória, sem alvo para o genoma humano) de *siRNA* foi utilizada como controle negativo.

A transfecção do *siRNA* foi realizada no dia 11 de cultura e amostras foram coletadas 48 e 72h após a transfecção (dias 13 e 14 de cultura; figura 29).

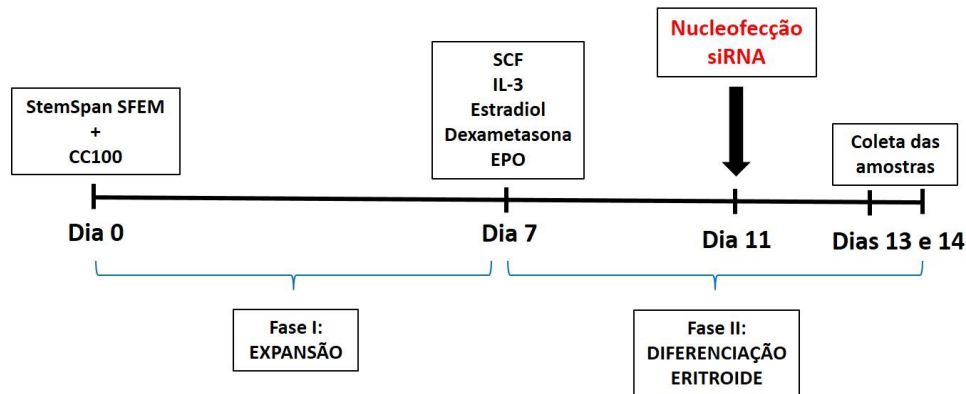


Figura 29. Esquema da cultura primária eritroide e silenciamento gênico por *siRNA*. A nucleofecção com *siRNA* foi realizada na fase II de cultura (de diferenciação eritroide), no dia 11 de cultura, e uma vez que o silenciamento gênico obtido com a utilização do *siRNA* é transiente, a coleta das amostras foi realizada 48 e 72h após a transfecção.

Na figura 30, a expressão de ambos os genes *YY1* e *HBG1* são apresentadas. O *knockdown* de *YY1* foi confirmado para as três sequências de *siRNA* empregadas, variando de ~20% a ~50% de silenciamento. Contudo, ao invés de ocorrer aumento da expressão do gene *HBG1*, como esperado, houve diminuição da expressão do gene *HBG1*. Essa diminuição da expressão do gene *HBG1* não está correlacionada de forma linear com os níveis de expressão de *YY1*.

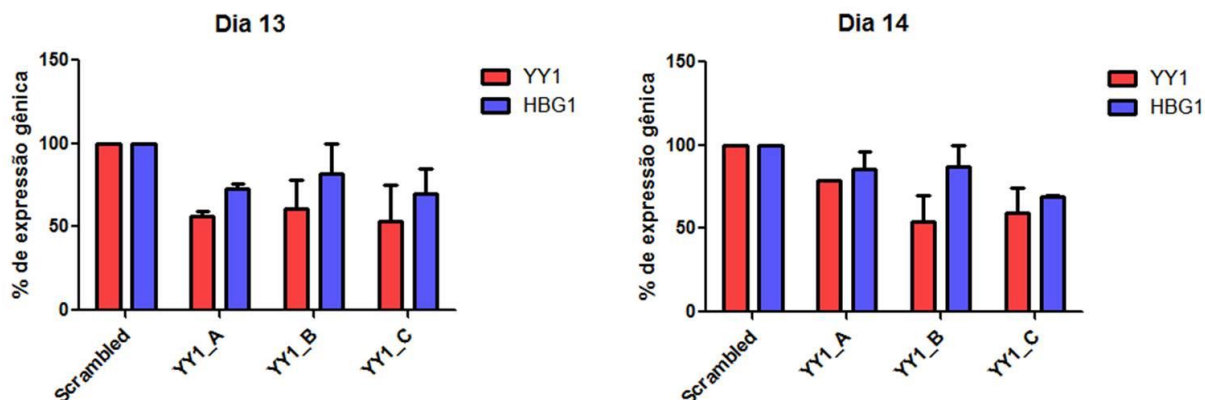


Figura 30. Expressão gênica relativa dos genes *YY1* e *HBG1* em células de cultura eritroide de indivíduo controle no ensaio de silenciamento do gene *YY1* por *siRNA*. São apresentados os dados de expressão gênica de amostras coletadas nos dias 13 (à esquerda) e 14 (à direita) de cultura eritroide, das células transduzidas com o vetor contendo a sequência *scrambled* (Scrambled) e com as diferentes sequências de *siRNA* para silenciamento do gene *YY1* (YY1_A, YY1_B, YY1_C). Os níveis de expressão gênica (RNAm) são mostrados em porcentagem.

Contudo, a realização do silenciamento gênico em outros pontos da cultura de células faz-se necessária, uma vez que o *knockdown* dos genes de interesse realizado antes da indução da diferenciação eritroide pode revelar resultados diferentes. Entretanto, para realizar o silenciamento gênico em estágios iniciais da cultura eritroide, é necessário utilizar ferramentas que possibilitem a expressão contínua da molécula interferente, em substituição ao *siRNA*, que promove expressão transiente do transgene. Assim, a ferramenta de silenciamento *shRNA* foi empregada.

5.8. Silenciamento gênico por partículas lentivirais contendo *shRNA* em cultura primária de células eritroides humanas

O silenciamento gênico utilizando moléculas de *shRNA* em vetores lentivirais pode promover expressão continuada do transgene de interesse. Essa técnica faz-se necessária uma vez que o uso de *siRNA* aplicada à cultura de células primárias promove o *knockdown* transiente do gene de interesse. Atualmente, diversos autores vêm realizando o silenciamento do gene com potencial envolvimento da regulação de globina- γ , na fase inicial da cultura eritroide, anterior à indução da expressão de globina- γ , para melhor compreender o envolvimento desses alvos na regulação de HbF (Lee et al., 2015; Krivega et al., 2015 e Masuda et al., 2016). Assim, realizamos diversos testes com diferentes protocolos descritos na literatura para realização da cultura primária de células humanas progenitoras eritroides, da

transdução viral e posterior seleção das células transduzidas. Por fim, estabelecemos um protocolo de cultura de células descrito por Mahajan e colaboradores (2009), combinado com o protocolo de transdução e seleção das células transduzidas descritas por Lee et al., 2015. Para tanto, as células CD34⁺ isoladas de sangue periférico de indivíduos normais foram mantidas em meio StemSpan™ SFEM (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) suplementado com StemSpan™ CC100 (Stemcell Technologies) por 7 dias (fase I, de expansão). As células então foram transduzidas com MOI=5 (MOI recomendado de 5 a 15) as partículas lentivirais controle e com alvo para o RNAm do gene *YY1*, no dia 3 de cultura (Figura 31). A seleção com 0,7 ug/mL de puromicina foi realizada entre os dias 4 e 7 de cultura, até a morte total do grupo de células não transduzidas (Figura 31). Assim, as células foram transferidas e mantidas por adicionais 7 dias no meio de cultura de diferenciação eritroide (fase II) que consiste no meio StemSpan™ SFEM suplementado com 20 ng/mL de SCF, 5 ng/mL de IL3, 2 uM de dexametasona, 0,2 uM de estradiol e 2 U/mL de EPO.

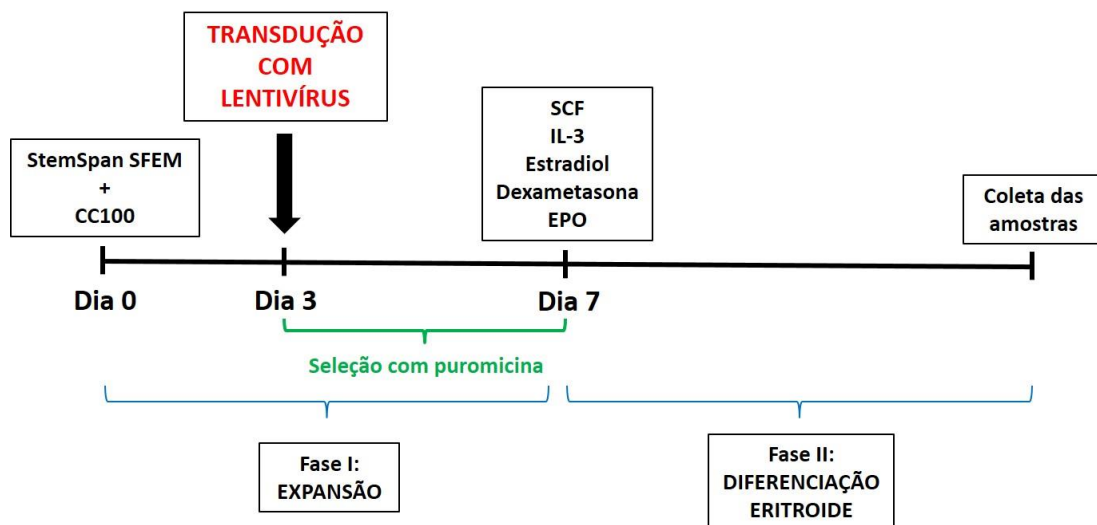


Figura 31. Esquema da cultura primária eritroide e silenciamento gênico por *shRNA*. A transdução com partículas lentivirais contendo *shRNA* foi realizada na fase I de cultura (de expansão celular), no dia 3 de cultura. A seleção com puromicina foi mantida até o dia 7 de cultura.

Na figura 32 estão apresentados os resultados de expressão relativa dos genes *YY1* e *HBG1* nos dias 10 e 14 de cultura. Em ambos os dias, é possível observar que nas células transduzidas com o *shRNA* para *YY1*, houve silenciamento do gene alvo de, aproximadamente, 50 %. Concomitante com a diminuição da expressão do gene *YY1*, houve o aumento da

expressão do gene *HBG1*, corroborando com a hipótese inicial de que o fator de transcrição YY1 possa ter papel na repressão do gene de globina- γ .

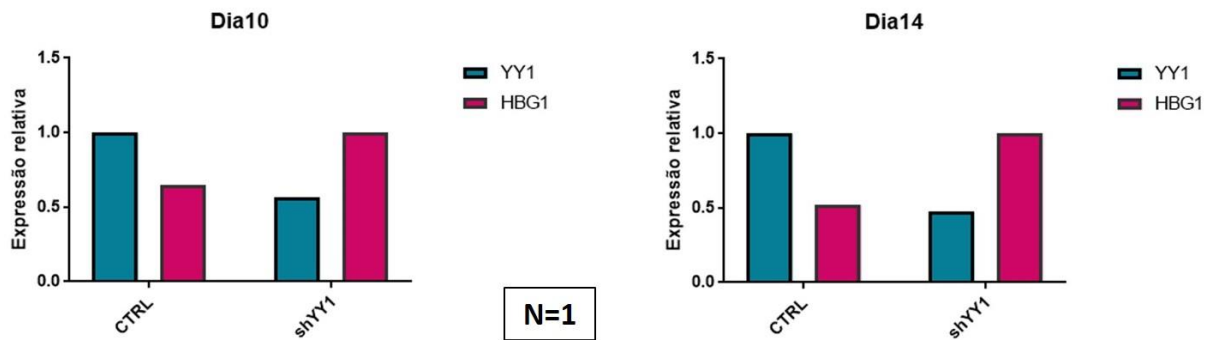


Figura 32. Expressão gênica relativa dos genes *YY1* e *HBG1* em células de cultura eritroide de indivíduo controle no ensaio de silenciamento do gene *YY1* por *shRNA*. São apresentados os dados de expressão gênica das células não transduzidas ou transduzidas com o vetor vazio ou com sequência *scrambled* (CTRL) e transduzidas com as partículas lentivirais contendo *shRNAs* com alvo para o gene *YY1* (shYY1), de amostras coletadas no dia 10 da cultura eritroide (à esquerda) e no dia 14 (à direita).

Os dados obtidos com as células da cultura primária eritroide humana são discordantes dos dados obtidos com o ensaio de silenciamento do gene *YY1* nas linhagens eritroleucêmicas humanas KU812 e K562. As células K562 são uma linhagem celular humana massivamente estudada com potencial eritroide e megacariocítica isolada de um indivíduo com leucemia mieloide crônica BCR-ABL+. Essas células podem expressar modestos níveis das globinas embrionárias e fetal, ζ , ϵ e γ , bem como uma produção mínima das cadeias α e β é observada (Cloe et al., 1981). Ou seja, essas células parecem recapitular um híbrido entre os estágios embriônico e fetal da eritropoese, mas nunca o estágio adulto. Assim, os resultados obtidos sobre a participação de alvos de estudo da etapa adulta de silenciamento do gene de globina- parece questionável. As células K562 e KU812 são de mesma origem mieloide eritroleucêmica e carregam a mesma fusão b3a2 Bcr-Abl (Goss et al., 2006), com a diferença de que as células KU812 apresentam maior expressão das cadeias globínicas β . Contudo, as células KU812, bem como outras linhagens celulares com potencial eritroide atualmente disponíveis (como as células HEL e MEL), não apresentam um padrão de expressão globínica característico de estágio eritroide adulto (Zein et al., 2010).

As culturas de células primárias eritroides humanas também são extensivamente utilizadas e uma grande diversidade de sistemas de cultura de duas fases tem sido descritos, com expansão dos progenitores hematopoéticos jovens na fase inicial e posterior indução à maturação eritroide na segunda fase da cultura. Uma clara vantagem desse método de cultura celular é a capacidade dessas células de modelar aspectos da eritropoese humana, incluindo o padrão de expressão gênica de estágio adulto, bem como expressar reguladores eritroides críticos como BCL11A, KLF1, e c-Myb (Bauer et al., 2012).

Frente ao exposto, os resultados obtidos com a cultura de células primárias eritroides parecem oferecer os dados mais fidedignos, uma vez que esse sistema de cultura de células representa o modelo eritroide mais próximo ao alvo do estudo: o estágio de eritropoese adulta, que envolve o silenciamento do gene de globina- γ . Contudo, experimentos adicionais devem ser realizados para que os resultados observados sejam comprovados.

6. CONCLUSÕES

6.1. Estudos com camundongos transgênicos β -YAC:

- TAL1, LMO2 e LDB1 parecem estar envolvidos na ativação da expressão do gene *HBG1* na presença da mutação -175 C>T.
- Os demais fatores de transcrição estudados, incluindo YY1 e PAX1, parecem não estar envolvidos na regulação do gene *HBG1* na presença das mutações -117, -175 e -195.
- Ainda que a utilização de modelos murinos seja de grande importância para a melhor compreensão dos diversos mecanismos moleculares investigados, esses modelos podem não refletir as mesmas vias de regulação gênica encontradas em humanos.

6.2. Estudos *in vitro* com células humanas:

- Os resultados em cultura de células progenitoras eritroides humanas, mas não nas linhagens K562 e KU812, indicam o envolvimento dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 na regulação do gene *HBG1*.
- As linhagens celulares K562 e KU812 são comumente utilizadas em estudos da diferenciação eritroide, contudo não apresentam o estágio adulto de eritropoese. Já a cultura primária de células humanas progenitoras eritroides serve de modelo da eritropoese humana, pois apresenta o padrão de expressão gênica de estágio adulto, bem como expressa reguladores eritroides críticos como BCL11A, KLF1, e c-Myb.
- Os resultados obtidos nesse trabalho indicam a importância da escolha do período da cultura eritroide no qual o silenciamento do gene candidato será realizada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinsheye I, Solovieff N, Ngo D, Malek A, Sebastiani P, Steinberg MH, Chui DH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. *Am J Hematol.* 2012;87(2):217-9.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4th edn. New York: Garland Science. 2002.
- Amoyal I, Fibach E. Hemoglobin switch in the newborn: a flow cytometry analysis. *Neonatology.* 2007;91(1):61-8.
- Anantharaman A, Lin IJ, Barrow J, Liang SY, Masannat J, Strouboulis J, Huang S and Bungert J. Role of helixloop-helix proteins during differentiation of erythroid cells. *Mol Cell Biol* 2011;31,1332-43.
- Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, Stachura DL, Cisson JL, Traver D. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development.* 2007;134(23):4147-56.
- Blau CA, Barbas CF 3rd, Bomhoff AL, Neades R, Yan J, Navas PA, Peterson KR. γ -Globin gene expression in chemical inducer of dimerization (CID)-dependent multipotential cells established from human β -globin locus yeast artificial chromosome (β -YAC) transgenic mice. *J Biol Chem.* 2005;280(44):36642-7.
- Blau CA, Peterson KR. Establishment of cell lines that exhibit correct ontogenic stage specific gene expression profiles from tissues of yeast artificial chromosome transgenic mice using chemically induced growth signals. *Methods Mol Biol.* 2006;349:163-73.
- Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Özgür Z, Gillemans N, Hou J, Bugeja M, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipsen S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2010;42(9):801-5.
- Borg J, Patrinos GP, Felice AE, and Philipsen S. Erythroid phenotypes associated with KLF1 mutations. *Haematologica.* 2011;96(5):635–8.

- Braghini CA, Costa FC, Fedosyuk H, Neades RY, Novikova LV, Parker MP, Winefield RD, Peterson KR. Generation of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin β -globin locus yeast artificial chromosome transgenic mouse models: -175 Black HPFH and -195 Brazilian HPFH. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016. pii: 1535370216636724. [Epub ahead of print]
- Bunn H, Forget BG. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. Published by WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US. 1986.
- Campbell AD, Cui S, Shi L, et al. Forced TR2/TR4 expression in sickle cell disease mice confers enhanced fetal hemoglobin synthesis and alleviated disease phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(46):18808-13.
- Chalepakis G, Fritsch R, Fickenscher H, et al. The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation. *Cell*. 1991;66:873-84.
- Charache S, Terrin M, Moore R, Dover G, Barton F, Eckert S. Effect of Hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995;332:1317–22.
- Chen Z, Luo HY, Basran RK, Hsu TH, Mang DW, Nuntakarn L, Rosenfield CG, Patrinos GP, Hardison RC, Steinberg MH, Chui DH. A T-to-G transversion at nucleotide -567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. *Mol Cell Biol*. 2008;28(13):4386-93.
- Costa FC, Fedosyuk H, Neades R, et al. Induction of Fetal Hemoglobin In Vivo Mediated by a Synthetic γ -Globin Zinc Finger Activator. *Anemia*. 2012a; (15):507894.
- Costa FC, Fedosyuk H and Peterson KR. Mi2beta is required for gamma-globin silencing: Temporal Assembly of a GATA-1-FOG-1-Mi2 Repressor Complex in beta YAC transgenic mice. *PLoS Genet*. 2012b;8(12):e1003155.
- Costa FF, Zago MA, Cheng G, et al. The Brazilian type of nondeletional A γ -fetal hemoglobin has a C>G substitution at nucleotide -195 of the A γ -globin gene. *Blood*. 1990;76(9):1896-7.
- Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet*. 2011;12(5):329-40.
- Déjardin J, Kingston RE. Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell*. 2009;136(1):175-86.

- Deutsch U, Dressler GR, Gruss P. Pax1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell*. 1988;53:617-25.
- Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-36.
- Dzierzak E. A developmental approach to hematopoiesis. In: Disorders of hemoglobin. Steinberg MH, Forget BG; Higgs D, Nagel RL (Eds). Cambridge University Press. Cambridge, UK. 2001.
- Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp Hematol*. 2008;36(12):1573-84.
- Fawcett DW. Bloom & Fawcett: Concise Histology (1st ed). Arnold Publishers Oxford, United Kingdom.; 1997.
- Filipe A, Li Q, Deveau S, et al. Regulation of embryonic/fetal globin genes by nuclear hormone receptors: a novel perspective on hemoglobin switching. *EMBO J*. 1999;18:687-97.
- Fordis CM, Anagnou NP, Dean A, Nienhuis AW, Schechter AN. A beta-globin gene, inactive in the K562 leukemic cell, functions normally in a heterologous expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(14):4485-9.
- Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann NY Acad Sci*. 1998;850:39-45.
- Fucharoen S, Siritanaratkul N, Winichaggon P, et al. Hydroxyurea increases hemoglobin F levels and improves the effectiveness of erythropoiesis in beta thalassemia/hemoglobin E disease. *Blood*. 1996;87:887-92.
- Gale RE, Clegg JB, Huehns ER. Human embryonic haemoglobins Gower 1 and Gower 2. *Nature*. 1979;280(5718):162-4.
- Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:139-58.
- Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*. 2005;8(3):365-75.
- GEN (Genetic Engineering & Biotechnology News). Tutorials; Next-Generation RNA Interference. Feb 15, 2006:26, No. 4 (<http://www.genengnews.com/gen-articles/next-generation-rna-interference/1321/>).

- Giardine B, Borg J, Higgs DR, et al. Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat Genet.* 2011;43(4):295-301.
- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene.* 2006;25(8):1125-42.
- Goss VL, Lee KA, Moritz A, Nardone J, Spek EJ, MacNeill J, Rush J, Comb MJ, Polakiewicz RD. A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood.* 2006;107(12):4888-97.
- Harju-Baker S, Costa FC, Fedosyuk H, Neades R, Peterson KR. Silencing of γ -globin gene expression during adult definitive erythropoiesis mediated by GATA-1-FOG-1 Mi2 complex binding at the -566 GATA site. *Mol Cell Biol.* 2008(28):3101-13.
- Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood.* 2011;118(24):6258-68.
- Hoggatt J, Kfoury Y, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:555-81.
- Jin L, Siritanaratkul N, Emery DW, Richard RE, Kaushansky K, Papayannopoulou T, Blau CA. Targeted expansion of genetically modified bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8093-7.
- Jin L, Zeng H, Chien S, Otto KG, Richard RE, Emery DW, Blau CA. In vivo selection using a cell-growth switch. *Nat Genet.* 2000;26(1):64-6.
- Jorge SE, Ribeiro DM, Santos MNN e Sonati MF. Hemoglobin: Structure, Synthesis and Oxygen Transport. In: Sick cell anemia: from basic science to clinical practice. Costa FF e Conran N (Eds). Springer International Publishing. Cham, CH. 2016.
- Kaplan G, Levy A, Racaniello VR. Isolation and characterization of HeLa cell lines blocked at different steps in the poliovirus life cycle. *J Virol.* 1989;63:43-51.
- Kiefer CM, Lee J, Hou C, Dale RK, Lee YT, Meier ER, Miller JL, Dean A. Distinct Ldb1/NLI complexes orchestrate γ -globin repression and reactivation through ETO2 in human adult erythroid cells. *Blood* 2011;118(23):6200-8.

- Kransdorf EP, Wang SZ, Zhu SZ, Langston TB, Rupon JW, Ginder GD. MBD2 is a critical component of a methyl cytosine-binding protein complex isolated from primary erythroid cells. *Blood*. 2006;108(8):2836-45.
- Krivega I, Byrnes C, de Vasconcellos JF, Lee YT, Kaushal M, Dean A, Miller JL. Inhibition of G9a methyltransferase stimulates fetal hemoglobin production by facilitating LCR/ γ -globin looping. *Blood*. 2015;126(5):665-72.
- Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J, Medvinsky A. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*. 2002;129(21):4891-9.
- Lécuyer E, Larivière S, Sincennes MC, Haman A, Lahlil R, Todorova M, Tremblay M, Wilkes BC, Hoang T. Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem* 2007;282:33649-58.
- Lee SU, Maeda M, Ishikawa Y, Li SM, Wilson A, Jubb AM, Sakurai N, Weng L, Fiorini E, Radtke F, Yan M, Macdonald HR, Chen CC, Maeda T. LRF-mediated Dll4 repression in erythroblasts is necessary for hematopoietic stem cell maintenance. *Blood*. 2013;121(6):918-29.
- Lee YT, de Vasconcellos JF, Byrnes C, Kaushal M, Rabel A, Tumburu L, Allwardt JM, Miller JL. Erythroid-Specific Expression of LIN28A Is Sufficient for Robust Gamma Globin Gene and Protein Expression in Adult Erythroblasts. *PLoS One*. 2015;16;10(12):e0144977.
- Ley TJ, DeSimone J, Noguchi NP, et al. 5-azacytidine increases gamma-globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1983;62:370-80.
- Li Q, Clegg C, Peterson K, Shaw S, Raich N, Stamatoyannopoulos G. Binary transgenic mouse model for studying the trans control of globin gene switching: evidence that GATA-1 is an in vivo repressor of human epsilon gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2444-8.
- Li Q, Stamatoyannopoulos JA. Position independence and proper developmental control of gamma-globin gene expression require both a 5' locus control region and a downstream sequence element. *Mol Cell Biol*. 1994;14(9):6087-96.

- Liu G, Geurts AM, Yae K, Srinivasan AR, Fahrenkrug SC, Largaespada DA, Takeda J, Horie K, Olson WK, Hackett PB. Target-site preferences of Sleeping Beauty transposons. *J Mol Biol* 2005;346:161-73.
- Liu L, Karmakar S, Dhar R, Mahajan M, Choudhury A, Weissman S, Pace BS. Regulation of γ -globin gene by ATF2 and its associated proteins through the cAMP response element. *PLoS One*. 2013;8(11):e78253.
- Luis TC, Killmann NM, Staal FJ. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia*. 2012;26(1):86-90.
- Magis W, Martin DI. HMG-I binds to GATA motifs: implications for an HPFH syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214:927-33.
- Mahajan MC, Karmakar S, Newburger PE, Krause DS, Weissman SM. Dynamics of alpha-globin locus chromatin structure and gene expression during erythroid differentiation of human CD34(+) cells in culture. *Exp Hematol*. 2009;37(10):1143-56.
- Martin DI, Tsai SF, Orkin SH. Increased γ -globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature* 1989;338:435-8.
- Masuda T, Wang X, Maeda M, Canver MC, Sher F, Funnell AP, Fisher C, Suciu M, Martyn GE, Norton LJ, Zhu C, Kurita R, Nakamura Y, Xu J, Higgs DR, Crossley M, Bauer DE, Orkin SH, Kharchenko PV, Maeda T. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. *Science*. 2016;351(6270):285-9.
- McDonagh KT, Lin HJ, Lowrey CH, Bodine DM, Nienhuis AW. The upstream region of the human γ -globin gene promoter. Identification and functional analysis of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem*. 1991;266:11965-4.
- McGaughran JM, Oates A, Donnai D, et al. Mutations in PAX1 may be associated with Klippel-Feil syndrome. *Europ. J. Hum. Genet*. 2003;11:468-74.
- McGrath KE, Frame JM, Fromm GJ, Koniski AD, Kingsley PD, Little J, Bulger M, Palis J. A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the β -globin locus in the mammalian embryo. *Blood*. 2011;117(17):4600-8.
- Mittler G, Butter F, Mann M. A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements. *Genome Res*. 2009;19(2):284-93.

- Molineux G, Foote M, Elliott S. Erythropoietins and Erythropoiesis (2nd ed). Basel, Switzerland: Birkhauser; 2009.
- Muralidhar SA, Ramakrishnan V, Kalra IS, Li W, Pace BS. Histone deacetylase 9 activates gamma-globin gene expression in primary erythroid cells. *J Biol Chem*. 2011;286(3):2343-53.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. The molecular and biochemical basis of genetic disease: hemoglobinopathies. In: Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Edited by Nussbaum RL. Published by WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US. 2004.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
- Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*. 2000;1(1),57-64.
- Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell*. 2005;8(3):377-87.
- Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6-7):1127-37.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*. 1999;126(22):5073-84.
- Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*. 2001;29(8):927-36.
- Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, et al. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal globin-gene-expression in the beta-globin disorders. *N Engl J Med*. 1993;328:81-6.
- Perutz MF. Species adaptation in a protein molecule. *Mol Biol Evol*. 1983;1(1):1-28.
- Peterson KR, Clegg CH, Huxley C, et al. Transgenic mice containing a 248-kb yeast artificial chromosome carrying the human beta-globin locus display proper developmental control of human globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(16):7593-7.
- Peterson KR, Fedosyuk H, Harju-Baker S. LCR 5' hypersensitive site specificity for globin gene activation within the active chromatin hub. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(22):11256-69.

- Peterson KR, Navas PA, Li Q, Stamatoyannopoulos G. LCR-dependent gene expression in beta-globin YAC transgenics: detailed structural studies validate functional analysis even in the presence of fragmented YACs. *Hum Mol Genet.* 1998;7(13):2079-88.
- Peterson, KR. Production and analysis of transgenic mice containing yeast artificial chromosomes. *Genet. Eng.* 1997;19, 235–55.
- Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 1: Principles [Internet]. 2nd edition. Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R et al., authors; Old J, editor. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation; 2013.
- Raich N, Clegg CH, Grofti J, Roméo PH, Stamatoyannopoulos G. GATA-1 and YY1 are developmental repressors of the human ϵ -globin gene. *EMBO J* 1995;14:801-9.
- Ramenzoni LL, Saito CP, McCormick JJ, Line SR. Transcriptional activity analysis of promoter region of human PAX9 gene under dexamethasone, retinoic acid, and ergocalciferol treatment in MCF-7 and MDPC23. *Cell Biochem Funct.* 2010; (7):555-64.
- Randhawa ZI, Jones RT, Lie-Injo LE. Human hemoglobin Portland II (zeta 2 beta 2). Isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. *J Biol Chem.* 1984;259(11):7325-30.
- Ranish JA, Hahn S, Lu Y, et al. Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIIH. *Nat Genet.* 2004;36(7):707-13.
- Roversi FM. Estudo dos potenciais mecanismos moleculares relacionados à expressão gênica diferencial em portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional tipo brasileira. 31/10/2011. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 31 de outubro de 2011. Retirado da Biblioteca Digital da UNICAMP.
(<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000835884&fd=y>).
- Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. K562 human leukaemic cells synthesize embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature.* 1979; 280:164-5.
- Sankaran VG, Menne TF, Xu J et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322(5909):1839-42.
- Lanaro C. Análise dos nucleotídeos cíclicos e sua associação com a produção de hemoglobina fetal na eritropoese in vitro de células CD34+ de pacientes com anemia

falciforme. 26/03/2007. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 26 de março de 2007. Retirado da Biblioteca Digital da UNICAMP(<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000430938&fd=y>).

- Schreiber R, Goncalves MS, Junqueira ML, Saad ST, Krieger JE, Costa FF. The A γ -195 (C>G) mutation in hereditary persistence of fetal hemoglobin is not associated with activation of a reporter gene in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(4):489–92.
- Smith CA, Tuan RS. Human PAX gene expression and development of the vertebral column. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;302:241-50.
- Song SH, Hou C and Dean A. A positive role for NLI/Ldb1 in long-range b-globin locus control region function. *Mol Cell* 2007;28,810-22.
- Stamatoyannopoulos G and Grosveld F. “Hemoglobin switching,” in *Molecular Basis of Blood Diseases*, G. Stamatoyannopoulos, P. Majerus, R. M. Perlmutter, and H. Varmus, Eds., pp. 135–182, W. B. Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 3rd edition, 2000.
- Stamatoyannopoulos G, Josephson B, Zhang JW, Li Q. Developmental regulation of human gamma-globin genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 1993;13(12):7636-44.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA.* 2003;289(13):1645-51.
- Sulahian R, Cleaver O, Huang LJ. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. *Blood.* 2009;113(21):5287-97.
- Takahashi T, Schreiber R, Krieger JE, Saad ST, Costa FF. Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (A γ -195 C>G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Eur J Haematol.* 2003;71(6):418-24.
- Tanabe O, McPhee D, Kobayashi S, et al. Embryonic and fetal beta-globin gene repression by the orphan nuclear receptors, TR2 and TR4. *EMBO J.* 2007;26(9):2295-306.
- Tanimoto K, Liu Q, Grosveld F, Bungert J, Engel JD. Contextdependent EKLF responsiveness defines the developmental specificity of the human ϵ -globin gene in erythroid cells of YAC transgenic mice. *Genes Dev.* 2000;14:2778-94.

- Tripic T, Deng W, Cheng Y, Zhang Y, Vakoc CR, Gregory GD, Hardison RC, Blobel GA. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood* 2009;113,2191-201.
- Urbinati F, Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. *Expert Ver Mol Med*. 2006;8(10):1-26.
- Vakoc CR, Letting DL, Gheldof N, Sawado T, Bender MA, Groudine M, Weiss MJ, Dekker J, Blobel GA. Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell* 2005;17(3):453-62.
- Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A and Rabbitts TH. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 1997;16,3145-57.
- Weatherall DJ. The thalasseмии. In: Stamatoyannopoulos G, ed. *Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia: WB Saunders; 1994:157-205.
- Wienert B, Funnell AP, Norton LJ, Pearson RC, Wilkinson-White LE, Lester K, Vadolas J, Porteus MH, Matthews JM, Quinlan KG, Crossley M. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun* 2015;6:7085.
- Wood WG. Hereditary Persistence and Fetal Hemoglobin and $\delta\beta$ Thalassemia. Disorders of Hemoglobin. In: Disorders of hemoglobin. Edited by Steinberg MH, Forget BG; Higgs D, Nagel RL. Published by Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2001.
- Xu J, Bauer DE, Kerenyi MA, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(16):6518-23.
- Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Côté J, Wang W. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*. 1998;2(6):851-61.
- Yan Q, Kamura T, Cai Y, et al. Identification of Elongin C and Skp1 sequences that determine Cullin selection. *J Biol Chem*. 2004;279(41):43019-26.
- Yao Y-L, DuPont BR, Ghosh S, et al. Cloning, Chromosomal Localization, and Promotor Analysis of the Human Transcription Factor YY1. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:3776-83.

- Yu M, Riva L, Xie H, Schindler Y, Moran TB, Cheng Y, Yu D, Hardison R, Weiss MJ, Orkin SH, Bernstein BE, Fraenkel E, Cantor AB. Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell* 2009;36,682-95.
- Yun WJ, Kim YW, Kang Y, Lee J, Dean A and Kim A. The hematopoietic regulator TAL1 is required for chromatin looping between the β -globin LCR and human γ -globin genes to activate transcription. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(7): 4283-93.
- Zein S, Li W, Ramakrishnan V, Lou TF, Sivanand S, Mackie A, Pace B. Identification of fetal hemoglobin-inducing agents using the human leukemia KU812 cell line. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010;235(11):1385-94.
- Zhang J, Socolovsky M, Gross AW, Lodish HF. Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood*. 2003;102(12):3938-46.
- Zhang J, Socolovsky M, Gross AW, Lodish HF. Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood*. 2003;102(12):3938-46.
- Zhang Y, Akinmade D, Hamburger AW. The ErbB3 binding protein Ebp1 interacts with Sin3A to repress E2F1 and AR-mediated transcription. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(18):6024-33.
- Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010;42(9):742-4.
- Zhu W, TomHon C, Mason M, et al. Analysis of linked human epsilon and gamma transgenes: effect of locus control region hypersensitive sites 2 and 3 or a distal YY1 mutation on stage-specific expression patterns. *Blood*. 1999;15;93(10):3540-9.

8. APÊNDICE

Original Research

Generation of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin β -globin locus yeast artificial chromosome transgenic mouse models: -175 Black HPFH and -195 Brazilian HPFH

Carolina A Braghini^{1,2}, Flavia C Costa³, Halyna Fedosyuk¹, Renee Y Neades¹, Lesya V Novikova¹, Matthew P Parker¹, Robert D Winefield⁴ and Kenneth R Peterson^{1,5}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160 USA; ²Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Sao Paulo, SP 13083, Brazil; ³IntelligeneDX, Olathe, KS 66061, USA; ⁴Analytical Core Laboratory, Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA; ⁵Department of Anatomy and Cell Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160 USA
Corresponding author: Kenneth R Peterson. Email: kpeterson@kumc.edu

Abstract

Fetal hemoglobin is a major genetic modifier of the phenotypic heterogeneity in patients with sickle cell disease and certain β -thalassemias. Normal levels of fetal hemoglobin postnatally are approximately 1% of total hemoglobin. Patients who have hereditary persistence of fetal hemoglobin, characterized by elevated synthesis of γ -globin in adulthood, show reduced disease pathophysiology. Hereditary persistence of fetal hemoglobin is caused by β -globin locus deletions (deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin) or γ -globin gene promoter point mutations (non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin). Current research has focused on elucidating the pathways involved in the maintenance/reactivation of γ -globin in adult life. To better understand these pathways, we generated new β -globin locus yeast artificial chromosome transgenic mice bearing the γ -globin -175 T > C or -195 C > G hereditary persistence of fetal hemoglobin mutations to model naturally occurring hereditary persistence of fetal hemoglobin. Adult -175 and -195 mutant β -YAC mice displayed a hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype, as measured at the mRNA and protein levels. The molecular basis for these phenotypes was examined by chromatin immunoprecipitation of transcription factor/co-factor binding, including YY1, PAX1, TAL1, LMO2, and LDB1. In -175 HPFH versus wild-type samples, the occupancy of LMO2, TAL1 and LDB1 proteins was enriched in HPFH mice (5.8-fold, 5.2-fold and 2.7-fold, respectively), a result that concurs with a recent study in cell lines showing that these proteins form a complex with GATA-1 to mediate long-range interactions between the locus control region and the γ -globin gene. Both hereditary persistence of fetal hemoglobin mutations result in a gain of γ -globin activation, in contrast to other hereditary persistence of fetal hemoglobin mutations that result in a loss of repression. The mice provide additional tools to study γ -globin gene expression and may reveal new targets for selectively activating fetal hemoglobin.

Keywords: Globin gene, sickle cell disease, hemoglobinopathies, HPFH, fetal hemoglobin, transgenic mice

Experimental Biology and Medicine 2016; 241: 697–705. DOI: 10.1177/1535370216636724

Introduction

Fetal hemoglobin (HbF) is the major genetic modifier of phenotypic heterogeneity in patients with the β -globin chain disorders like sickle cell disease (SCD) and certain β -thalassemias. Continued expression of γ -globin chains results in increased HbF levels, which acts to replace missing normal adult hemoglobin (HbA) resulting from mutated or absent β -globin chains in these two β -hemoglobinopathies, respectively.¹ In newborns, the HbF level comprises 60 to 80% of total hemoglobin; however, the level gradually

decreases to approximately 1% between 6 and 12 months of age. The β -like chain component of this hemoglobin switching is characterized by the progressive silencing of the *HBG1* (γ -globin) and *HBG2* (γ -globin) genes with concomitant activation of *HBB* (β -globin), and to a lesser extent *HBD* (δ -globin), gene expression in bone marrow.² Although the normal level of HbF postnatally is approximately 1% of total hemoglobin, some individuals have a condition known as hereditary persistence of fetal

hemoglobin (HPFH), marked by elevated synthesis of γ -globin chains in adulthood.^{3,4} HPFH is classified as one of two types: (1) deletional HPFH or (2) non-deletional HPFH. Deletional HPFH is characterized by large deletions (13 to 106 kb), which may include partial or full deletion of the *HBD* and *HBB* genes. Increased *HBG* gene expression and thus, higher HbF levels, are associated with variable compensation for the partial or total lack of *HBD* and/or *HBB* gene expression. Non-deletional HPFH is a complex inherited trait caused by inheritance of one of the three major quantitative trait loci (QTL), the *XmnI* site upstream of the *HBG2* gene (chromosome 11p15), *BCL11A* (chromosome 2p16), or the *HBS1L-MYB* intergenic polymorphism (HMIP, chromosome 6q23), or by a Mendelian inherited trait, caused by point mutations and minor deletions in the promoter regions of the *HBG* genes.⁵

Pharmacological agents such as butyrate, decitabine, and hydroxyurea are effective in inducing HbF *in vitro* and *in vivo*. To date, hydroxyurea is the only drug approved for clinical use in sickle cell patients, although the efficacy level is variable between patients and the long-term effects of this drug remain uncertain.^{6,7} Therefore, current research has focused on elucidating the pathways involved in the maintenance/reactivation of γ -globin gene expression in adult life. Heterozygous individuals for the Mendelian non-deletional HPFHs have HbF levels varying from 5 to 40%, but the mechanism that leads to the increased HbF expression has not been totally unveiled. The most likely hypothesis is that the point mutations or minor deletions in the γ -globin gene promoter can alter the binding sites for transcription factors that regulate *HBG1* and *HBG2* gene expression. Many studies have demonstrated the role of ubiquitous or stage-specific transcription factors in β -like globin gene switching, indicating their potential as therapeutic targets in the treatment of β -hemoglobinopathies. The transcription factor B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/lymphoma 11A (*BCL11A*) was shown to function as a repressor of HbF expression, interacting with numerous co-repressors in the β -globin locus leading to reconfiguration of the chromatin in this region.^{1,8} When Krüppel-like factor 1 (*KLF1*), an *HBB*-specific transcriptional activator, was knocked down in CD34⁺ cells, γ -globin expression was induced.⁹ Moreover, many mutations in the *KLF1* gene were associated with increased levels of HbF.^{10,11} Since *KLF1* is also a direct activator of *BCL11A*, it may play a crucial role in the switch from *HBG* to *HBB* expression, by direct activation of *HBB* and indirect silencing of the γ -globin genes via activation of *BCL11A*.⁹ Forced expression of orphan nuclear receptor proteins TR2/TR4 enhanced HbF expression in adult erythroid cells and ameliorated many of the pathophysiological characteristics of SCD in humanized SCD mice.¹² In addition, many HPFH mutations directly or indirectly affect the binding of transcription factors. For example, GATA-1 is a constituent of the repressor complex GATA-1-FOG-1-Mi2 β that binds at the -567 G γ /-566 A γ -globin GATA motifs.¹³⁻¹⁵ Point mutations (T > G transversions) at these sites alter the GATA-1 binding motifs, increasing HbF levels *in vitro* and *in vivo*. The -567 G γ -globin transversion was associated with HPFH in two members of an Iranian-American family.¹⁵

To better understand the molecular pathways involved in regulating γ -globin gene expression, we generated two new mutant β -globin locus yeast artificial chromosome (β -YAC) transgenic mouse models: (1) A γ -globin -175 T > C Black HPFH β -YAC mice and (2) A γ -globin -195 C > G Brazilian HPFH β -YAC mice. This study describes the phenotypic characterization of these lines, as well as some basic insight into the molecular mechanisms underlying these HPFHs. Inclusion of these models with previously characterized wild-type β -YAC mice and mutant A γ -globin -117 G > A Greek HPFH β -YAC mice as controls, both in the data presented here and in future studies, will more comprehensively demarcate the complex mechanics of γ -globin gene silencing and reveal potential targets for therapeutic manipulation of HbF expression, thus leading to effective treatments for SCD and certain β -thalassemias.

Material and methods

-175 and -195 A γ -globin HPFH β -YAC transgenic mice

β -YAC transgenic mice were generated essentially as described¹⁴ using a 213 kb β -YAC containing the human β -globin locus. Briefly, yeast-integrating plasmid (YIP) pRS406 containing a 5.4 kb marked A γ -globin gene (A γ^m) *SspI* fragment (GenBank file U01317 coordinates 38,683–44,077) was mutagenized using the Quick Change Site-Specific Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) to introduce the A γ -globin -175 T > C Black HPFH or the -195 C > G Brazilian HPFH mutations. The presence of the mutations was confirmed by DNA sequence analysis of a PCR-amplified fragment encompassing the mutated region. Transformation of wild-type β -YAC-bearing yeast, “pop-in”, “pop-out” homologous recombination in yeast, screening of positive yeast clones, YAC purification, mouse transgenesis, and structural analysis/copy number determination of YAC transgenes was performed as described previously.¹⁴

Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

β -like globin gene expression was measured as previously described.¹⁴ In summary, total RNA was isolated from transgenic mouse adult blood using the Quick-RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Seven hundred nanograms of total RNA was used to generate cDNA using the iScript Reverse Transcription Supermix RT-qPCR kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR was performed with SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) using a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) to assess the expression of the murine α -globin genes, and human β - and γ -globin genes. Three sets of cDNA for duplicate samples were amplified, and the $\Delta\Delta C_T$ method was used to calculate the relative expression of the target genes. The expression of the human β - and γ -globin genes was normalized to expression of the murine α -globin genes. Results are shown as fold increase relative to wild-type β -YAC samples.

RNase protection assay (RPA)

RNase protection assay (RPA) reactions were carried out essentially as described.¹⁶ Data include the means and standard deviations from three separate experiments, each of which included total RNA from the adult blood of two individual animals for each transgenic line.

Flow cytometry

Flow cytometry was carried out as previously described with some modifications.¹⁴ Blood was collected from the tail vein of mice in phosphate-buffered saline/ethylenediaminetetraacetic acid (PBS/EDTA) and washed by adding 10 μ L to 990 μ L PBS and centrifuging at $200 \times g$ for 5 min at 4°C in a swinging bucket rotor. Pellets were resuspended in 4% paraformaldehyde, incubated at room temperature for 30 min, followed by centrifugation. The pellet was resuspended in 1 mL ice-cold acetone/methanol (4:1), incubated on ice for 1 min, and centrifuged. Pellets were washed twice in PBS/0.1% BSA (PB) and blocked in 50 μ L PBT (PB containing 0.1% triton X 100) containing 40 μ g/mL normal goat immunoglobulin G (IgG) (sc-2028, Santa Cruz Biotechnology, Saint Louis, MO, USA) at room temperature for 30 min. Cells were washed twice in PB and resuspended in PBT containing 0.5 μ g sheep anti-human hemoglobin F conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (A80-136A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) for each sample. A sample lacking primary antibody was included as a negative control. Cells were incubated 30 min at room temperature, washed twice in PB, resuspended in 400 μ L PB, and analyzed using a BD LSR II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with a 530/30 nm (FITC/GFP) emission filter. Data from 30,000 events were acquired for analysis using BD FACS Diva software (BD Biosciences).

Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS)

Mouse hemoglobin samples were prepared according to Masala and Manca¹⁷ Briefly, each 30 μ L sample was treated with anticoagulant (3 μ L 50 mM EDTA, pH 8.0). Red blood cells (RBCs) were collected by centrifugation ($250 \times g$, 10 min, 4°C). The pellet, comprising packed RBCs, was washed three times with 120 μ L aliquots of 0.9% (w/v) NaCl before lysis by vortexing (10 s pulse) in 30 μ L of deionized water and 12 μ L of neat CCl_4 . The hemoglobin-bearing aqueous phase was collected by centrifugation ($20,000 \times g$, 10 min, 4°C) and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) within 24 h of extraction. During the interval between extraction and analysis, hemoglobin samples were stored at 4°C. All samples were filtered (Millipore 25 mm, 0.45 μ m Millex-LCR hydrophilic PTFE filter, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) prior to analysis. Total protein concentration in the clarified cell lysates was determined using a Bio-Rad Quick Start Bradford Protein assay kit according to manufacturer's instructions. These data were used to insure that the efficiency of hemoglobin extraction was not attenuated by variations in the ratio of reagent to sample.

High-pressure liquid chromatography (HPLC)-based analysis was carried out using an Acquity Classic UPLC System (Waters, Milford, MA, USA). Mouse hemoglobin samples and human hemoglobin instrument qualification standards (10 μ L) were initially loaded in 95% solvent A (0.05% trifluoroacetic acid (TFA) in deionized water), 5% solvent B (0.05% TFA in 7:3 acetonitrile:isopropanol) onto a Sigma-Aldrich Supelco BioShell C4 (2.1 mm \times 150 mm, 400 Å pores, 3.4 μ m fused core particles) RP-HPLC column. The globin chains were resolved with a programmed gradient (500 μ L/min) comprised of solvents A and B (95% A, 5% B from 0–4 min, 65% A, 35% B from 4–19 min, 50% A, 50% B from 19–19.5 min, 100% B from 19.5–22 min, 95% A, 5% B from 22–25 min). The effluent from the column was unevenly split (post-column) between a Waters Synapt HDMS hybrid time of flight mass spectrometer (150 μ L/min), equipped with an electrospray source, and solvent waste (350 μ L/min). The split was accomplished by back-pressure manipulation using tubing of varying length to control the flow through a high pressure (0.020 in) tee junction. The instrument was operated in sensitivity mode with the cone voltage ramped between 20 and 40 V. Positive ion spectra (1 s scans) were acquired over a mass range of 250–2500 m/z, while simultaneously collecting lock mass correction data (for postacquisition correction) using the Synapt HDMS auxiliary sprayer to introduce (1 s scans) leucine enkephalin (YGGFL) peptide every 30 s. The spectra of NaI cluster ions were collected under the same conditions and used to perform time to mass calibration.

Instrument function and data acquisition were controlled using Waters Mass Lynx 4.1 (SCN 872) software. The identity of the hemoglobin species residing within each peak was determined using the Mass Lynx MaxEnt 1 algorithm to deconvolute the multiply-charged ESI spectra associated with each peak-spectrum and to determine the zero-charge spectrum for the parent molecule that gave rise to the chromatographic peak. Quantification of each hemoglobin species was accomplished by manually integrating the area under the total ion current chromatographic peaks using Mass Lynx software.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as previously described with some modifications.¹⁴ Single-cell suspensions from postconception day E18 fetal livers from wild-type, -175 HPFH, and -195 HPFH β -YAC transgenic mice were prepared as described. Cells were incubated with 2 mM ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate] (EGS) for 30 min. Cellular proteins and DNA were cross-linked by incubation in the presence of 1% fresh paraformaldehyde (10 min, room temperature) before the reaction was quenched by the addition of glycine to a final concentration of 125 mM. Chromatin was sonicated to a size range between 200 and 1000 bp and 20 μ g of chromatin were used for each immunoprecipitation. Immunoprecipitations were carried out with specific antibodies against YY1 (sc-1703), PAX1 (sc-25407 X), GATA-1 (sc-265 X), TAL1 (sc-12984), LDB1 (sc-11198), from Santa

Cruz Biotechnology and LMO2 from R&D Systems (AF2726, Minneapolis, MN, USA) and control isotype-matched IgG antibodies (rabbit and goat from Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. The chromatin samples were incubated for 4 h at 4°C with 50 µL of Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA). The immunoprecipitate was washed, the cross-links were reversed, and the genomic DNA was purified by the phenol:chloroform:isoamyl alcohol method. Recruitment of the transcription factors listed above was measured by real-time qPCR, using gene-specific primers for the γ -globin gene promoter region.¹³

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Prism version 5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data presented are mean \pm standard deviation (SD). Unpaired two-tailed *t*-test was used and *P*-values < 0.05 were considered significant.

Results

The -175 T > C and -195 C > G HPFH mutations elevate HbF levels in β -YAC transgenic mice

Three -175 HPFH and two -195 HPFH β -YAC transgenic mouse lines were produced with a 213 kb β -globin locus YAC, containing a 187 kb human chromosomal insert that encompassed the entire 82 kb β -globin locus from 5'HS5 of the locus control region (LCR) to 3'HS1, approximately 20 kb downstream from the β -globin gene (Figure 1). UPLC-MS analysis showed that -175 HPFH mice had the highest average level of γ -globin chains (mean of lines = 25.8% $\gamma/[\gamma + \beta]$), followed by -195 HPFH mice (mean of lines = 18.4%; Table 1). Wild-type β -YAC control mice did not express γ -globin, and -117 Greek HPFH β -YAC control mice displayed an average of 13.8%. Measurement of γ -globin mRNA by RPA (Figure 2) supported the HPLC data;

$\gamma/(\gamma + \beta)$ was 34%, 12%, 14.1%, and 0% for -175 HPFH, -195 HPFH, -117 HPFH, and wild-type β -YAC animals, respectively (Table 1). Relative mRNA levels as determined by RT-qPCR were consistent with the RPA results (Table 1).

Flow cytometry was used to determine HbF distribution in adult RBCs (Figure 3). -175 and -195 HPFH mice exhibited heterocellular HbF distribution, whereas -117 HPFH control mice showed a pancellular distribution as previously documented.¹⁸ These data are consistent with the phenotypes observed in human subjects, except for the -175 distribution, which is pancellular in patients.³ The HbF levels also are consistent with those found in human patients, ranging between 36–41%, 4.5–16%, 12–16% and less than 1% in -175 T > C, -195 C > G and -117 G > A HPFH, and normal subjects, respectively.^{3,19} Since our new HPFH models show γ -globin expression levels (transcript and chain) and HbF distribution patterns reflective of those found in the human population, they are useful tools for exploring fetal γ -globin gene regulatory mechanisms. Copy number-corrected human β - and γ -globin gene expression normalized to copy number-corrected mouse α -globin gene expression demonstrated that the resultant increase in γ -globin gene expression associated with the -175 and -195 HPFH mutations was accompanied by a concomitant β -globin decrease, supporting the competition model between γ - and β -globin for interaction with the LCR. The average values were 58.44% β , 21.01% γ for -175, 62.75% β , 15.53% γ for -195, and 74.00% β , 11.01% γ for -117, compared to 96.50% β , 0% γ for wild-type.

TAL1, LMO2 and LDB1 bind the -175 T > C gene promoter when HBG1 is activated in -175 HPFH β -YAC transgenic mice

Several studies have shown that regulation of β -like globin gene expression is mediated in part by a LDB1/LMO2/GATA-1/TAL1 complex, which promotes the interaction via looping between the gene promoters and the LCR.^{20–25}

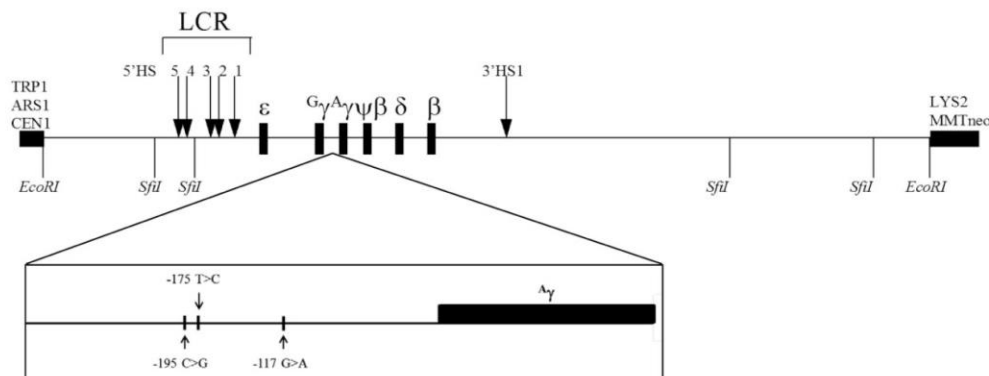


Figure 1 Human β -globin locus 213 kb yeast artificial chromosome (β -YAC). Upstream of the HBE gene (ϵ) is the locus control region (LCR), defined as a set of four erythroid specific and developmentally stable DNase I-hypersensitive sites (5' HS). Another developmentally stable HS, termed 3' HS1, is present ~20 kb 3' to the HBB gene (β). Also present in this construct are the yeast TRP1 gene, origin of replication, ARS1 (autonomously replicating sequence), a centromere, CEN1, the LYS2 gene, and a mammalian selectable marker cassette, MMTneo, encoding G418 resistance. Two restriction sites for *EcoRI* and four for *SfiI* relevant to generation and structural characterization of this YAC are indicated below the line. In the expanded square below the YAC map, the position and nucleotide changes of the three HPFH mutations included in this study are shown

Table 1 Mean \pm standard deviation for γ -globin chain (UPLC) and mRNA levels (RPA and RT-qPCR), in different lines of β -YAC mice, normalized to the total β -like globin chain or mRNA levels, respectively; $[\gamma/(\beta + \gamma)] \times 100$

Mouse line	Copy number	% $\gamma/(\gamma + \beta)^a$		RPA		RT-qPCR
		UPLC	RPA	Per copy γ -globin expression ^b	Per copy β -globin expression ^b	γ/α^c
-175 #4	2	26.39 \pm 2.68	25.33 \pm 2.52	13.23 \pm 5.88	51.00 \pm 19.18	448 \pm 234
-175 #27	2	20.75 \pm 0.88	34.67 \pm 4.04	27.80 \pm 7.33	79.15 \pm 19.01	1323 \pm 147
-175 #57	1	29.88 \pm 2.22	42.00 \pm 5.20	22.01 \pm 7.59	45.18 \pm 32.25	234 \pm 20
-195 #9	3	15.91 \pm 2.08	10.67 \pm 1.82	10.19 \pm 4.83	73.00 \pm 25.71	245 \pm 89
-195 #18	4	14.67 \pm 0.22	13.38 \pm 3.49	20.87 \pm 10.07	52.50 \pm 9.15	223 \pm 32
-117 (control)	2	13.75 \pm 0.85	14.05 \pm 1.05	11.01 \pm 3.08	74.00 \pm 12.00	420 \pm 76
Wild type β -YAC	3	0	0	0	96.50 \pm 10.61	1 \pm 0.11

Note: RT-qPCR values are normalized to the murine α -globin mRNA.

UPLC: ultra performance liquid chromatography, four experimental replicates; RPA: RNase protection assay, three experimental replicates; RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction, three experimental replicates.

^aMean \pm standard deviation.

^b(Hu γ or β / β -YAC copy number)/(Mo α /4) \times 100; mean \pm standard deviation.

^cFold increase relative to wild-type β -YAC.

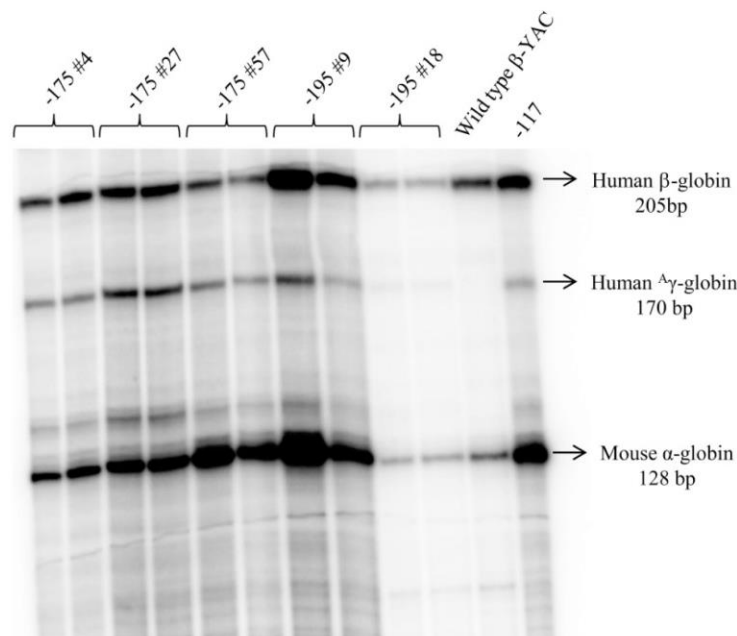


Figure 2 RPA results of the human β -globin and γ -globin and mouse α -globin mRNA in the -175 #4, -175 #27, -175 #57, -195 #9, and -195 #18 HPFH mouse lines compared to the wild-type β -YAC line (negative control) and the -117 line (positive control)

A recent study using cell lines demonstrated that the -175 HPFH mutation results in recruitment of part of this protein complex to the γ -globin gene promoter with concomitant gene activation.²⁶ The -175 HPFH T > C mutation results in the creation of an E-box motif, to which TAL1 binds. We performed ChIP using antibodies against these four transcription factors to verify that this complex is involved in γ -globin gene activation *in vivo* in -175 HPFH mutant mice.

Postconception day E18 fetal liver is a developmental time point where γ -globin is normally silent; thus, it was chosen for our analysis. Our data indicate that the transcription factors TAL1, LMO2, and LDB1 showed a significant difference in occupancy ($P < 0.05$; Figure 4) of the *HBG1* gene promoter in the presence of the -175 C > T mutation compared to the control wild-type β -YAC mice and the IgG antibody control.

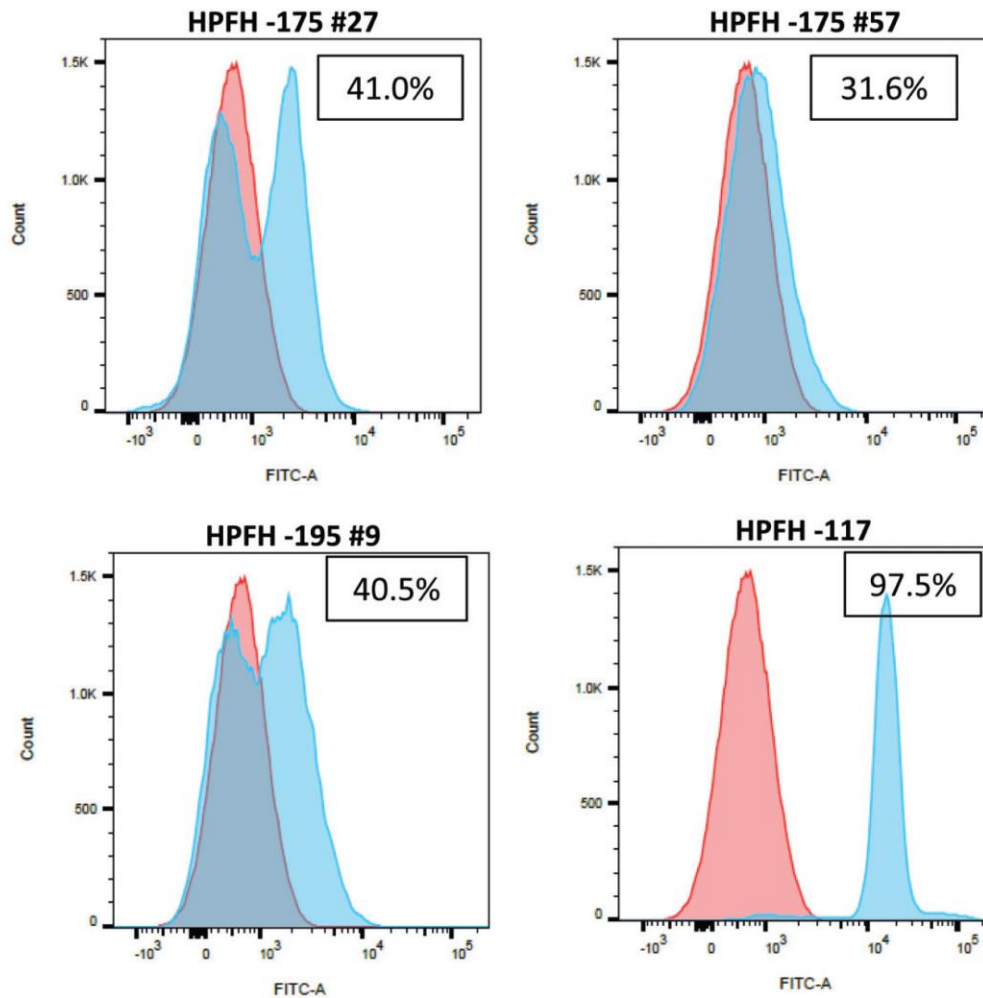


Figure 3 Flow cytometry analysis of cells isolated from adult mouse blood samples labeled with HbF antibody conjugated with FITC. Each panel shows a comparison between a HPFH line (in blue) and the non-transgenic control mice sample (in red). The percentage shown in each graphic is the HbF-expressing cell population after subtraction of the non-transgenic (non-HbF-expressing) background. Data representative of duplicate experiments are shown

GATA-1 often works in combination with TAL1 to activate erythroid gene expression^{27,28} and the TAL1 binding we observe could be dependent upon GATA-1 occupancy.²² However, our results did not show a statistically significant difference in the recruitment of GATA-1 between the wild-type and -175 β -YAC mice to the *HBG1* gene promoter (data not shown). Our results are consistent with those of Weinert et al.,²⁶ who demonstrated that in murine mouse erythroleukemia (MEL) and human K562 cells in the presence of the -175 T > C Black HPFH mutation, fetal globin expression was increased through *de novo* recruitment of the activator TAL1 which interacts with LDB1 and LMO2 to promote looping of the distal LCR to the modified γ -globin promoter.

The molecular mechanism involved in HBG1 gene activation in the presence of -195 C > G HPFH mutation remains uncertain

We did not find any statistically significant enrichment for any of the transcription factors tested for by ChIP in the presence of the -195 HPFH mutation compared to wild-type β -YAC transgenic mice. We included YY1 and PAX1 in our analysis since previous data by our research group using serial analysis of gene expression (SAGE), DNA-protein array, and ChIP with human erythroid progenitor cell culture implicated the involvement of these two transcription factors in *HBG1* gene regulation in the -195 promoter (data not shown).

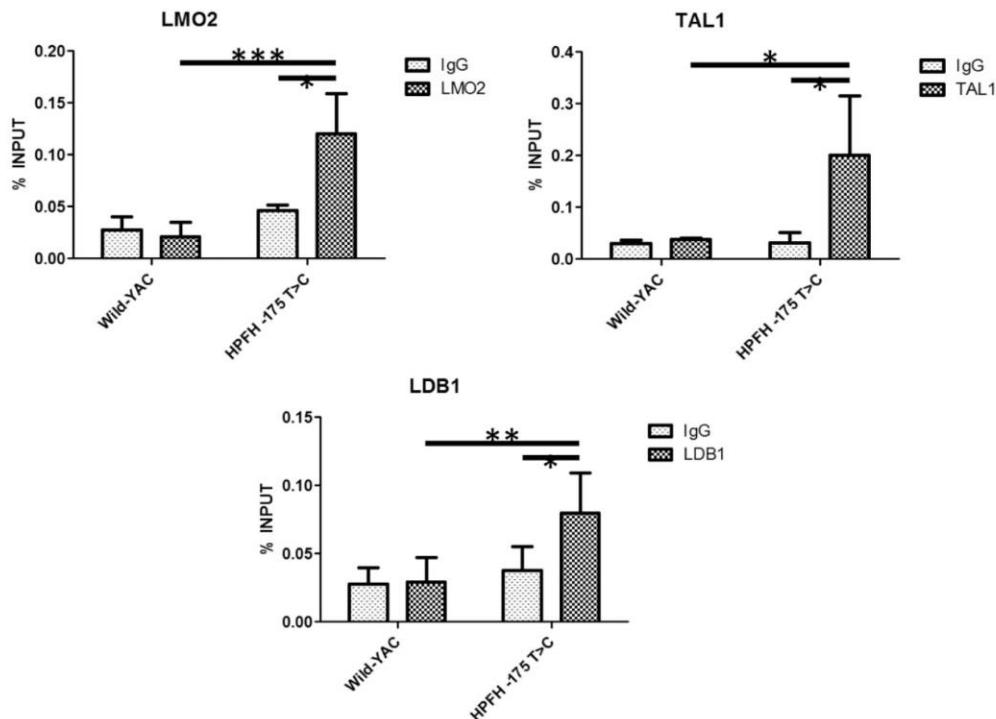


Figure 4 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) analysis using fetal liver samples of wild-type β -YAC transgenic mice (wild-YAC) and β -YAC transgenic mice carrying the HPFH -175 T > C mutation (HPFH -175 T > C), using anti-TAL1, anti-LMO2, and anti-LDB1 antibodies. For these three transcription factors, significant enrichment of occupancy ($P < 0.05$) in the *HBG1* gene promoter region was verified only in the samples with the -175 T > C mutation. Data are shown as mean \pm standard deviation for at least four experiments. * = P -value < 0.05; ** = P -value < 0.01; *** = P -value < 0.001

Discussion

The C > G point mutation identified at position -195 of the *HBG1* gene was described by Costa et al.²⁹ and is associated with moderate elevation of HbF levels in heterozygotes, ranging between 6.0 and 16.0%. Not much is known about the molecular mechanism regulating *HBG1* gene expression via the -195 promoter region. In three different cell lines (K562, HEL, and HEK293), the -195 C > G mutation increases promoter-linked luciferase gene expression in the presence of a LCR 5' hypersensitive site 2 (5'HS2) fragment.^{30,31} Although *HBG1* gene reactivation in the -198 T > C British HPFH mutation is mediated by the SP1 transcription factor, the same mechanism does not apply to the -195 HPFH mutation.³¹ Our results using SAGE, DNA-protein array, and ChIP in human erythroid progenitor CD34⁺ cells isolated from six individuals (three normal donors and three individuals carrying the -195 C > G HPFH mutation) indicated the involvement of YY1 and PAX1 in *HBG1* gene regulation (unpublished data not shown). γ -globin reactivation appears to be characterized by a decrease in YY1 binding, since the -195 C > G substitution in the *HBG1* gene promoter abrogates YY1 binding

with a concomitant increase of PAX1 binding in this DNA region. Although PAX1 has never been implicated in globin gene regulation, YY1 has been shown to be involved in embryonic ϵ -globin regulation. A YY1 binding site located near -269 of the *HBE* gene promoter overlaps two GATA-1 binding sites.³² Mutation of this YY1 binding site leads to continued ϵ -globin expression in adulthood, indicating that YY1 functions as part of a *HBE* gene repressor.³³

However, we did not find the same occupancy pattern of YY1 and PAX1 at the promoter region of *HBG1* gene. At first, we hypothesized that the observed difference between human erythroid progenitor CD34⁺ cells and transgenic mice might be due to the inherent nature of the two experimental systems. In postconception day E18 fetal livers of wild-type β -YAC transgenic mice, the γ -globin to β -globin (HbF to HbA) switch already occurred and the γ -globin genes are silenced by this time. In contrast, in human erythroid progenitor cells, on day 13 of culture on which the experiments were carried out, expression of γ -globin was relatively high due to the addition of erythropoietin in the culture medium (erythropoietin was added to the cell culture medium at day 0 of culture). Thus, analysis of fetal livers at postconception day E12 may be more appropriate,

since the γ -globin to β -globin switch has not occurred and the γ -globin genes are still expressed. However, we did not find statistically significant difference in the occupancy of YY1 and PAX1 between the wild-type and -195 C > G *HBG1* gene promoter regions in post-conception day E12 fetal liver samples from β -YAC transgenic mice (data not shown). We will continue to perform experiments to ascertain the proteins that bind this region of the γ -globin promoter, both at the wild-type sequence and the HPFH mutant sequence.

ChIP analysis of wild-type β -YAC and -175 HPFH β -YAC mice showed a significant difference in occupancy of the -175 C > T *HBG1* gene promoter sequence by the transcription factors TAL1, LMO2, and LDB1. TAL1 is a basic helix-loop-helix transcription factor required for the development of all hematopoietic lineages³⁴ that binds to different regulatory regions of the globin genes in the human β -globin locus.^{22,23,25,26} LDB1 acts as a bridging factor to bring protein complexes bound at distant DNA binding sites in close proximity for interaction with one another via DNA looping.³⁵ LDB1 has a C-terminal LIM domain allowing the protein to interact other members of the complex by binding LMO2.²² LMO2 predominantly interacts with TAL1 in hematopoietic cells. The interaction between TAL1 and LMO2 in turn stabilizes the LDB1 complex and modulates the activity of the complex.³⁶ Several studies indicate that GATA-1 binds in the -175 region of the *HBG1* gene^{37,38} and interacts with TAL1 to activate erythroid gene expression.^{27,28} In addition, TAL1 binding is dependent upon GATA-1 occupancy.²² However, our results show that GATA-1 is not part of the activation complex in the presence of the -175 mutant *HBG1* gene promoter. Similarly, Wienert et al.²⁶ demonstrated that in the presence of the -175 mutation in mouse MEL cells or human K562 cells, fetal globin expression was increased through *de novo* recruitment of TAL1 which interacted with LDB1 and LMO2 to promote chromatin looping of the distal LCR to the modified γ -globin promoter. Their data showed that GATA-1 recruitment was enhanced only 1.7-fold in the presence of the -175 mutation compared to the wild-type promoter sequence, indicating that GATA-1 does not play a key role in the activation of *HBG1* gene in the presence of this HPFH mutation.

Maintenance of *HBG1* expression in our adult HPFH mice parallels the phenotypes associated in human subjects carrying either of the HPFH mutations, demonstrating the validity of our -175 and -195 HPFH mouse models. Our preliminary ChIP data looking at the molecular mechanisms underlying these HPFHs indicate that these HPFH β -YAC transgenic lines are highly relevant for *in vivo* studies of β -like globin gene regulation, particularly mechanisms of γ -globin gene repression and activation.

Authors' contributions: CAB designed and performed experiments, interpreted data, and wrote the manuscript; FCC designed and performed experiments and interpreted data; HF performed experiments and interpreted data; RYN performed experiments and interpreted data; LVN performed experiments and interpreted data; MPP performed

experiments and interpreted data; RDW performed experiments and interpreted data; KRP designed and performed experiments, interpreted data, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the National Institutes of Health, R01 HL111264, R01 DK100595 and R01 DK081290 awarded to KRP. Support for the UPLC-MS instrumentation was provided by the National Center for Research Resources (P20 RR021940) and the National Institute of General Medical Sciences (P20 GM103549) of the National Institutes of Health. Financial support for visiting scholar CAB was provided by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; 2014/17413-9).

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.


REFERENCES

- Xu J, Bauer DE, Kerenyi MA, Vo TD, Hou S, Hsu YJ, Yao H, Trowbridge JJ, Mandel G, Orkin SH. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:6518–23
- Amoyal I, Fibach E. Hemoglobin switch in the newborn: a flow cytometry analysis. *Neonatology* 2007;91:61–8
- Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann NY Acad Sci* 1998;850:39–44
- Wood WG. Hereditary persistence and fetal hemoglobin and $\delta\beta$ thalassemia. Disorders of hemoglobin. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs D, Nagel RL (eds). *Disorders of hemoglobin*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001
- Akinsheye I, Solovieff N, Ngo D, Malek A, Sebastiani P, Steinberg MH, Chui DH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. *Am J Hematol* 2012;87:217–9
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Sauntharajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D, Terrin M. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 2003;289:1645–51
- Orah S, Platt MD. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2008;358:1362–9
- Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, Mikkola HK, Hirschhorn JN, Cantor AB, Orkin SH. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 2008;322:1839–42
- Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet* 2010;42:742–4
- Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Özgür Z, Gillemans N, Hou J, Bugeja M, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipsen S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet* 2010;42:801–5
- Borg J, Patrinos GP, Felice AE, Philipsen S. Erythroid phenotypes associated with KLF1 mutations. *Haematologica* 2011;96:635–8
- Campbell AD, Cui S, Shi L, Urbonya R, Mathias A, Bradley K, Bonsu KO, Douglas RR, Halford B, Schmidt L, Harro D, Giacherio D, Tanimoto K, Tanabe O, Engel JD. Forced TR2/TR4 expression in sickle

- cell disease mice confers enhanced fetal hemoglobin synthesis and alleviated disease phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:18808–13
13. Harju-Baker S, Costa FC, Fedosyuk H, Neades R, Peterson KR. Silencing of γ -globin gene expression during adult definitive erythropoiesis mediated by GATA-1-FOG-1-Mi2 complex binding at the –566 GATA site. *Mol Cell Biol* 2008;**28**:3101–13
 14. Costa FC, Fedosyuk H, Chazelle AM, Neades RY, Peterson KR. Mi2 β is required for γ -globin gene silencing: temporal assembly of a GATA-1-FOG-1-Mi2 repressor complex in β -YAC transgenic mice. *PLoS Genet* 2012;**8**:e1003155
 15. Chen Z, Luo HY, Basran RK, Hsu TH, Mang DW, Nuntakarn L, Rosenfield CG, Patrinos GP, Hardison RC, Steinberg MH, Chui DH. A T-to-G transversion at nucleotide –567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. *Mol Cell Biol* 2008;**28**:4386–93
 16. Peterson KR, Fedosyuk H, Harju-Baker S. LCR 5' hypersensitive site specificity for globin gene activation within the active chromatin hub. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:11256–69
 17. Bruno Masala, Laura Manca, Detection of globin chains by reversed-phase high-performance liquid chromatography. In: Everse J, Vandegriff KD, Winslow RM (eds) *Hemoglobins, part B: Biochemical and analytical methods*, Volume 231 (Methods in Enzymology). 1 ed. San Diego: Academic Press, 1994
 18. Costa FC, Fedosyuk H, Neades R, de Los Rios JB, Barbas CF 3rd, Peterson KR. Induction of fetal hemoglobin in vivo mediated by a synthetic γ -globin zinc finger activator. *Anemia* 2012;**2012**:507894
 19. Roversi FM. Estudo dos potenciais mecanismos moleculares relacionados à expressão gênica diferencial em portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional tipo brasileira (Doctoral dissertation), www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000835884&fd=y (accessed 17 February 2016)
 20. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, Rabbitts TH. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 1997;**16**: 3145–57
 21. Vakoc CR, Letting DL, Gheldof N, Sawado T, Bender MA, Groudine M, Weiss MJ, Dekker J, Blobel GA. Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell* 2005;**17**:453–62
 22. Song SH, Hou C, Dean A. A positive role for NLI/Ldb1 in long-range β -globin locus control region function. *Mol Cell* 2007;**28**:810–22
 23. Kiefer CM, Lee J, Hou C, Dale RK, Lee YT, Meier ER, Miller JL, Dean A. Distinct Ldb1/NLI complexes orchestrate γ -globin repression and reactivation through ETO2 in human adult erythroid cells. *Blood* 2011;**118**:6200–8
 24. Song SH, Kim A, Dale R, Dean A. Ldb1 regulates carbonic anhydrase 1 during erythroid differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1819**:885–91
 25. Yun WJ, Kim YW, Kang Y, Lee J, Dean A, Kim A. The hematopoietic regulator TAL1 is required for chromatin looping between the β -globin LCR and human γ -globin genes to activate transcription. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**: 4283–93
 26. Wienert B, Funnell AP, Norton LJ, Pearson RC, Wilkinson-White LE, Lester K, Vadolos J, Porteus MH, Matthews JM, Quinlan KG, Crossley M. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun* 2015;**6**:7085
 27. Tripic T, Deng W, Cheng Y, Zhang Y, Vakoc CR, Gregory GD, Hardison RC, Blobel GA. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood* 2009;**113**:2191–201
 28. Yu M, Riva L, Xie H, Schindler Y, Moran TB, Cheng Y, Yu D, Hardison R, Weiss MJ, Orkin SH, Bernstein BE, Fraenkel E, Cantor AB. Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell* 2009;**36**:682–95
 29. Costa FF, Zago MA, Cheng G, Nechtman JE, Stoming TA, Huisman THJ. The Brazilian type of nondeletional γ -fetal hemoglobin has a C > G substitution at nucleotide –195 of the γ -globin gene. *Blood* 1990;**76**:1896–7
 30. Schreiber R, Goncalves MS, Junqueira ML, Saad ST, Krieger JE, Costa FF. The γ -195 (C > G) mutation in hereditary persistence of fetal hemoglobin is not associated with activation of a reporter gene in vitro. *Braz J Med Biol Res* 2001;**34**:489–92
 31. Takahashi T, Schreiber R, Krieger JE, Saad ST, Costa FF. Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (γ -195 C > G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Eur J Haematol* 2003;**71**:418–24
 32. Li Q, Stamatoyannopoulos JA. Position independence and proper developmental control of gamma globin gene expression require both a 5' locus control region and a downstream sequence element. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:6087–96
 33. Raich N, Clegg CH, Grofti J, Roméo PH, Stamatoyannopoulos G. GATA-1 and YY1 are developmental repressors of the human ϵ -globin gene. *EMBO J* 1995;**14**:801–9
 34. Anantharaman A, Lin IJ, Barrow J, Liang SY, Masannat J, Strouboulis J, Huang S, Bungert J. Role of helixloop-helix proteins during differentiation of erythroid cells. *Mol Cell Biol* 2011;**31**:1332–43
 35. Deng W, Lee J, Wang H, Miller J, Reik A, Gregory PD, Dean A, Blobel GA. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell* 2012;**149**:1233–44
 36. Lécuyer E, Larivière S, Sincennes MC, Haman A, Lahlil R, Todorova M, Tremblay M, Wilkes BC, Hoang T. Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem* 2007;**282**:33649–58
 37. Martin DI, Tsai SF, Orkin SH. Increased γ -globin expression in a non-deletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature* 1989;**338**:435–8
 38. Liu G, Geurts AM, Yae K, Srinivasan AR, Fahrenkrug SC, Largaespada DA, Takeda J, Horie K, Olson WK, Hackett PB. Target-site preferences of Sleeping Beauty transposons. *J Mol Biol* 2005;**346**:161–73

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I: Parecer consubstanciado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de ciências Médicas

<p>FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)</p>	
--	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do papel dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 nos mecanismos moleculares envolvidos na persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional tipo Brasileira

Pesquisador: Carolina Ayumi Braghini

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 5

CAAE: 02756912.7.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 254.694

Data da Relatoria: 12/04/2013

Apresentação do Projeto:

Será utilizada técnica de RNA de interferência para silenciar dois fatores de transcrição, o PAX1 e o YY1, em linhagem celular K562 e cultura de células primárias CD34+ de indivíduos com persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional do tipo Brasileira, para posterior avaliação do papel desses fatores de transcrição na regulação do gene HBG1 e, em consequência, na produção de hemoglobina fetal. Esses experimentos serão realizados no intuito de melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos na persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional do tipo Brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

Elucidar o papel dos fatores de transcrição NF-E1/YY1 e PAX1 nos mecanismos moleculares envolvidos na Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal não deletional tipo Brasileira.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa, sendo que os benefícios sociais do estudo estão relacionados à construção do conhecimento. Também não há riscos relevantes, somente sendo citado o desconforto e o pequeno risco da coleta de sangue periférico.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887
UF: SP	Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187
	E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pretende-se confirmar ou refutar a hipótese de que o fator de transcrição YY1 age como repressor do gene HBG1 (tipo selvagem); e o fator de transcrição PAX1 atua como ativador do mesmo gene na presença da mutação -195 C>G, estando, ambos, envolvidos nos mecanismos moleculares da ndPHHF-B.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto assinada pela pesquisadora e identificando como responsável pela proponente coordenadora do Hemocentro/Unicamp. Projeto de pesquisa gerado pela Plataforma Brasil com todos os itens preenchidos, incluindo cronograma e orçamento adequado. Foram apresentados dois modelos de TCLE, um para o grupo de estudo e outro para o grupo controle.

Recomendações:

As pendências foram atendidas. Projeto relevante e adequado em todos os seus itens. TCLE reformulado e adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, após resolução de pendências.

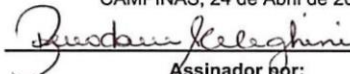
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 24 de Abril de 2013

P/ 
Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
Coordenadora de Comitê de Ética em Pesquisa
PRP / UNICAMP
Matrícula: 28700-9

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

9.2. ANEXO II: Termos de consentimentos livre e esclarecido apresentados aos voluntários controles e portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal não-delecional tipo Brasileira



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Indivíduos com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

Título da Pesquisa: “Investigação do papel dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 nos mecanismos moleculares envolvidos na persistência hereditária de hemoglobina fetal não delecional tipo Brasileira”

Nome do paciente: _____

Idade: _____ anos HC: _____

Endereço: _____

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade ou incapacitado):

Grau de parentesco: _____

Endereço: _____

Algumas pessoas, mesmo depois de adultos, continuam apresentando níveis relativamente elevados de um tipo de hemoglobina (a hemoglobina fetal) que, normalmente, tem sua produção bastante reduzida depois do 6º mês de vida, aproximadamente. Esta alteração, conhecida como Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), não é uma doença, mas entender o que acontece em pessoas com esta alteração seria de grande importância para algumas doenças, como a anemia falciforme. O presente projeto pretende estudar um tipo específico (não delecional tipo Brasileira) de PHHF. O estudo pretende investigar os mecanismos moleculares que podem

estar relacionados com o surgimento dessa alteração e que estariam levando ao aumento dos níveis de HbF.

Fui convidado(a) e aceito participar deste estudo e sei que ele será importante para entendermos melhor a PHHF que tenho. Sei que fornecerei uma amostra de 54 mL de sangue que será coletado junto com os meus exames de rotina de laboratório ou no momento da doação de sangue. Estou ciente de que os riscos dessa coleta são os mesmos de qualquer coleta de exame de sangue: dor da picada da agulha e algumas vezes hematoma (ou mancha roxa). Sei que essa coleta será realizada numa veia do braço, por um profissional da saúde treinado e qualificado para me atender. Estou ciente de que posso sair do estudo a qualquer momento e que isso não irá prejudicar o meu atendimento médico na Unicamp. Sei ainda que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador e o meu material biológico coletado não será armazenado, mas sim descartado logo após a realização dos experimentos em laboratório. Concordei em participar dessa pesquisa por livre e espontânea vontade, sem qualquer despesa de minha parte, e sem qualquer tipo de pagamento por esta colaboração.

Qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar por Carolina Ayumi Braghini (Fone: 3521-8611, pesquisadora responsável pelo estudo) ou pelo Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (Fone: 3521-8611, supervisor responsável pelo estudo), Hemocentro - Unicamp e qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do comitê de Ética na Rua Tessália Vieira de Camargo, 162 – FCM, Unicamp, Fone: 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi os esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente. Por estar de acordo com o conteúdo da carta de consentimento, dato e assino em duas vias, ficando uma em minha posse.

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador legal

Campinas, ____/____/____



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Indivíduos do Grupo Controle

Título da Pesquisa: “Investigação do papel dos fatores de transcrição YY1 e PAX1 nos mecanismos moleculares envolvidos na persistência hereditária de hemoglobina fetal não deletional tipo Brasileira”

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos RG: _____

Endereço: _____

Fui convidado(a) e aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (54 mL) a ser coletada da veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado como controle para comparação neste projeto de pesquisa. Sei que os riscos dessa coleta são os mesmos de qualquer coleta de exame de sangue: dor da picada da agulha e algumas vezes hematoma (ou mancha roxa). Sei que essa coleta será realizada numa veia do braço, por um profissional da saúde treinado e qualificado para me atender. Estou ciente de que minha participação na pesquisa não implica em nenhum benefício para mim, uma vez que servirei apenas como controle normal. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Sei também que o meu material biológico coletado não será armazenado, mas sim descartado logo após a realização dos experimentos em laboratório. Concordei em participar desta pesquisa por livre e espontânea vontade, sem qualquer despesa de minha parte e sem qualquer tipo de pagamento por esta colaboração.

Qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar por Carolina Ayumi Braghini (Fone: 3521-8611, pesquisadora responsável pelo estudo) ou pelo Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (Fone: 3521-8611, supervisor responsável pelo estudo), Hemocentro - Unicamp e qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a

secretaria do comitê de Ética na Rua Tessália Vieira de Camargo, 162 – FCM, Unicamp, Fone: 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi os esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente. Por estar de acordo com o conteúdo da carta de consentimento, dato e assino em duas vias, ficando uma em minha posse.

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador legal

Campinas, ____/____/____

9.3. ANEXO III: Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei n° 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Mecanismos moleculares de regulação do gene HBG1 associados aos genótipos - 195 C>G, -175 T>C e -117 G>A de persistência hereditária de hemoglobina fetal não-delecional**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25 de agosto de 2016

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Carolina Ayumi Braghini**
RG n.º 30790998-0

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Fernando Ferreira Costa**
RG n.º 4607982